

**LIMITIERTE FIBRINOGENOLYSE WÄHREND DER
LAGERUNG VON VOLLBLUTKONSERVEN UND
FRESH FROZEN PLASMA**

OLIVER SHULTE - DERNE

~~1986~~

Disbui. München

1987



Aus der Medizinischen Klinik III im Klinikum
Großhadern der Universität München
Direktor: Professor Dr. W. Wilmanns

**LIMITIERTE FIBRINOGENOLYSE WÄHREND DER LAGERUNG VON
VOLLBLUTKONSERVEN UND FRESH FROZEN PLASMA**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Oliver Schulte-Derne

aus

Grünwald

Jahr

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. W. Wilmanns

Mitberichterstatter:

1. Prof. Dr. Dr. H. Fritz
2. Prof. Dr. W. Schramm

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter:

Dr. W. Klaubert

Dekan:

Prof. Dr. Dr.h.c. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung:

03.12.1987

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. EINLEITUNG

2. VERSUCHSARBEIT

2.1. Beschreibung der Versuchsanordnung	3
2.2. Versuchsaufbau	3
2.3. Versuchsaufbau	13
2.4. Versuchsaufbau	16
2.5. Versuchsaufbau	18

3. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

3.1. Festlegung der Versuchsaufgaben	24
3.2. Sachverhalte und Vorgehensweise	24
3.3. Versuchsplan	25
3.4. Versuchsaufbau	26
3.5. Versuchsaufbau	27
3.6. Versuchsaufbau	28
3.7. Versuchsaufbau (2. Teil)	29
3.8. Versuchsaufbau	30
3.9. Versuchsaufbau	31

INHALTSVERZEICHNIS:

	SEITE
<u>1. EINLEITUNG</u>	1
<u>2. GRUNDLAGEN</u>	
2.1. Entwicklung der Bluttransfusion	3
2.2. Elastase	7
2.3. Fibrinogen	11
2.4. Blutgerinnung	16
2.5. Fibrino(geno)lyse	19
<u>3. MATERIAL UND METHODIK</u>	
3.1. Probenmaterial	24
3.2. Entnahmetechnik und Verarbeitung	24
3.3. Gerinnbares Protein	25
3.4. Laser-Nephelometrie	26
3.5. AT-III funktionell	27
3.6. Elastase	28
3.7. Fibrinopeptid A (FPA)	29
3.8. F-CB 3	30
3.9. Immunadsorption	31

3.10. Reduktive Spaltung	32
3.11. Elektrophoresen-Ansatz	34
3.12. Färben der Gele	34
3.13. Densitometrische Auswertung	34
3.14. Bestimmung der Molekulargewichte	34
3.15. Statistik	35

4. ERGEBNISSE

4.1. VOLLBLUTKONSERVEN	36
4.1. 1. Fibrinogen	38
4.1. 2. Fibrinopeptid A	38
4.1. 3. Antithrombin-III	40
4.1. 4. F-CB 3	41
4.1. 5. Elastase	41
4.1. 6. Korrelation Elastase-und F-CB 3-Werte	43
4.1. 7. α -1-Antitrypsin und α -2-Macroglobulin	45
4.1. 8. C3c, C4	45
4.1. 9. Elektrophoresen, nicht reduziertes Material	46
4.1.10 Elektrophoresen, reduziertes Material	48

4.2. FRESH FROZEN PLASMA	50
4.2. 1. Fibrinopeptid A	50
4.2. 2. F-CB 3	50
4.2. 3. Elastase	51
4.2. 4. α -2-Macroglobulin	51
4.2. 5. C3c,C4	51
4.2. 6. Elektrophoresen,nicht reduziertes Material	52
4.2. 7. Elektrophoresen, reduziertes Material	53
<u>5. DISKUSSION</u>	54
<u>6. ZUSAMMENFASSUNG</u>	59
<u>7. LITERATUR</u>	62

1. EINLEITUNG

Die Substitution von Blutverlusten mit Spenderblut hat die Prognose vieler ernsthafter Erkrankungen wesentlich verbessert. Mit der Zunahme von Transfusionen konnte aber auch eine Zunahme von Transfusionsnebenwirkungen beobachtet werden (15,16,41-44,50,57,100). Ein Beispiel ist die "Posttransfusionslunge", die vorzugsweise nach der Transfusion von größeren Blutvolumen bei schwerkranken Patienten wie z.B. mit Polytrauma oder Sepsis beobachtet wird (3,17,19,90,91,101). Veränderungen nach Transfusionen können aber auch im Kapillarbereich anderer Organe auftreten und zum Multiorganversagen führen.

Da transfusionsbedingte Komplikationen die Prognose der betroffenen Patienten deutlich verschlechtern können, ist es wichtig, die pathogenetischen Zusammenhänge zwischen der Bluttransfusion und diesen Komplikationen aufzudecken. Nur so kann unter Ausschöpfung des Transfusionsnutzens das Transfusionsrisiko möglichst gering gehalten werden.

Änderungen während der Lagerung des Blutes müssen dabei berücksichtigt werden. Stoffwechselvorgänge, Zellalterung und Zellzerfall können zur Akkumulation biologisch aktiver Proteine in den Blutkonserven führen. So wurden



ansteigende Serotonin-und Histaminspiegel in Blutkonserven nachgewiesen. (43)

In neueren in vitro Versuchen wurde gezeigt, daß beim proteolytischen Abbau von Fibrinogen Peptide anfallen, die ausgeprägte vasoaktive und permeabilitätssteigernde Eigenschaften besitzen. (23,92,93,94,99,Abb.1 und Abb.2) Es ist deshalb Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob und gegebenenfalls welche fibrino(geno)lytischen Abbauvorgänge in Vollblutkonserven und fresh frozen plasma ablaufen, und welcher Einfluss auf solche Prozesse dabei der PMN-Elastase zukommt.

2. GRUNDLAGEN

2.1. Die Geschichte der Bluttransfusion (97)

1665 Die Royal Society gründet eine Kommission, die es sich zur Aufgabe macht, die Übertragung verschiedenartiger Flüssigkeiten auf Tiere und auf Menschen zu untersuchen.

1767 Die erste Transfusion von Tierblut auf den Menschen wird von J. Baptist Denis durchgeführt.

1817 James Blundel, ein englischer Geburtshelfer und Physiologe, rettet nach zahlreichen tierexperimentellen Versuchen das Leben einer verblutenden Wöchnerin durch eine Bluttransfusion. Dies ist die erste bekanntgewordene Bluttransfusion von Mensch zu Mensch.

1874 Landois veröffentlicht eine statistische Übersicht über 476 Transfusionen. Bei Verwendung von menschlichem Blut kam es in ca 50% zu einem günstigen Ausgang, bei Verwendung von Tierblut allerdings nur in ca. 25% der Fälle.

- 1875 Als Ursache der Transfusionszwischenfälle nach Tierblutübertragung wird von Landois die Auflösung der transfundierten Erythrozyten erkannt.
- 1883 E. von Bergmann hält, von zahlreichen Mißerfolgen bei der Transfusion von Fremdblut beeindruckt, vor der Militärärztlichen Akademie in Berlin eine vernichtende Rede, die allgemein als "Leichenrede der Bluttransfusion" in die Geschichte eingeht.
- 1900 K.Landsteiner und Decastello entdecken die menschlichen Blutgruppen des ABO-Systems. Landsteiner wird dafür 30 Jahre später der Nobelpreis verliehen.
- 1914 De'Agosta und Hustin stellen unabhängig voneinander die gerinnungshemmende Wirkung des Natriumcitrats fest.
- 1916 Rous und Turner weisen nach, daß durch Zufügen von Zucker zu konserviertem Blut die Konservierungsdauer beträchtlich verlängert wird. Sie legen damit die Grundlage zur Entwicklung der heutigen modernen Stabilisatoren.

1926 Hesse und Bagdazarov gründen in Rußland die ersten Institute, die sich wissenschaftlich ausschließlich mit Bluttransfusionsfragen befassen.

1940 Landsteiner und Wiener weisen durch Immunantikörper das wichtigste Antigen des Rh-Systems (D) nach. In rascher Folge werden in den folgenden Jahren die weiteren Antigene des Rh-Systems nachgewiesen sowie weitere für die Transfusionsmedizin wichtige Blutgruppensysteme entdeckt.

1942 Entwicklung der Plasmafraktionierung durch Cohn.

1945 Weltweit werden Blutbanken aufgebaut. In der BRD entstehen 1951 die ersten Bluttransfusionsdienste.

Die Entdeckung und Berücksichtigung der Blutgruppenserologie hatte die Rate der Transfusionszwischenfälle gesenkt. Wegen der außerordentlich großzügig gestellten Indikationsstellung und damit hohen Transfusionsrate kam es trotzdem weiterhin zu einer Vielzahl von Komplikationen.

Heute wird deshalb die Indikation zur Bluttransfusion wesentlich kritischer gesehen. Eine weitere Senkung der Anzahl der Transfusionszwischenfälle erhofft man sich heute von der gezielten Transfusion einzelner Blutkomponenten. Es setzt sich zunehmend die Überlegung durch, dem Patienten nur die Blutbestandteile zu transfundieren, die er auch wirklich benötigt.

2.2. PMN-ELASTASE

Erstmals wird im Jahre 1905 von OPIE (79) über die proteolytische Wirkung von entzündlichen Exsudaten berichtet, der 1922 (80) die polymorphkernigen Granulozyten als Träger dieser Proteasen erkennt. Die systematische Erforschung der granulozytären Enzyme beginnt jedoch erst im Laufe der siebziger Jahre.

1968 wird erstmals von JANOFF und SCHERER (49) die elastinolytische und von LAZARUS et al (54) eine kollagenolytische Wirkung der leukozytären Granula nachgewiesen. Diese Befunde lösen eine intensive Suche nach der Lokalisation und den Eigenschaften einzelner Granulozytenenzyme aus. In den azurophilen Granula findet man neben sauren Hydrolasen (β -Glycerophosphatase, N-Acetyl- β -Glucosaminidase, β -Glucuronidase, α -Mannosidase, Cathepsin D und Cathepsin B) und weiteren bacteriziden Substanzen (Myeloperoxidase, Lysozym) auch die neutralen Proteasen Elastase, Kathepsin G und Proteinase 3 (21,31, 70,77,95,102). Als erste dieser lysosomalen Enzyme wird die Elastase von den Arbeitsgruppen um JANOFF (48,49) und OHLSSON (66,73) aus den Granulozyten isoliert und eingehend biochemisch charakterisiert. (2,4,21,24,31,95, 102)

Nach elektrophoretischer Auftrennung lassen sich 3 bis 4 Isoenzyme nachweisen (48,67,73), die sowohl in der Immundiffusion wie auch in der zweidimensionalen Immunelektrophorese identisch reagieren. Unterschiede ergeben sich jedoch in der Höhe des Zucker- und des Arginingehaltes (3,102,104). Verschiedene Arbeitsgruppen ermitteln dabei eine Molekülmasse der Elastase von 30.000-34.000 Dalton (48,69,73,89,104). Das Wirkungsoptimum gegenüber natürlichen oder künstlichen Substraten liegt im neutralen bis leicht alkalischen Bereich (pH 7,6-8,6) (69). Neben einer proteolytischen Wirkung auf Elastin (72) und Proteoglykan (69) zeigt Elastase eine fibrinogenolytische Aktivität (73,86,89), weshalb im Unterschied zur plasmininduzierten Fibrinogenolyse vom "alternative pathway" gesprochen wird.

Quantitativ ergibt sich für die Elastase ein Gesamtgehalt von $2,7 \pm 0,66 \mu\text{g}$ pro 1 Million polymorphkerniger Granulozyten (75). Täglich treten ca. 1,5 Milliarden polymorphkernige Granulozyten (18) pro kg Körpergewicht und damit ca. 300 mg zellgebundene Elastase aus dem Knochenmark in die Zirkulation über.

OHLSSON bestimmt die Serumkonzentration der Elastase mit 135 ng/ml. Sowohl aus diesem Wert als auch aus der ermittelten Eliminationshalbwertszeit des E- α 1-Antitrypsin Komplexes errechnet OHLSSON (65,76) eine täglich aus den Granulozyten freigesetzte Elastasemenge von 10 mg. Dieser Wert entspricht dabei etwa 3% der gesamten zellgebundenen Elastasemenge.

Nach Freisetzung wird die Granulozyten-Elastase durch körpereigene Inhibitoren rasch inaktiviert (20,71,74,76 78). Die Bindung erfolgt zu 92% an α 1-Antitrypsin und zu 8% an α 2-Macroglobulin (73). Für Elastase- α 2-Macroglobulin Komplexe ergibt sich eine Halbwertszeit von 12 Minuten, mit der sie aus der Zirkulation eliminiert werden; die Halbwertszeit für Elastase- α 1-Antitrypsin-Komplexe beträgt dagegen 1 Stunde. (66,71) Freie Elastase ist im Patientenplasma normalerweise nicht nachweisbar. Wegen dieser hohen und schnellen Bindung an α 1-Antitrypsin kann von der Konzentration des Elastase- α 1-Antitrypsin Komplexes auf die Menge freigesetzter Elastase geschlossen werden.

Möglicherweise ergänzen sich beide Inhibitorsysteme in dem Sinne, daß Elastase zur rascheren Elimination über das RES aus dem Komplex mit α_1 -Antitrypsin auf α_2 -Macroglobulin übertragen wird (68,70,71).

2.3. FIBRINOGEN

Blutgerinnung und Fibrinolyse stehen in einem physiologischen Gleichgewicht. Eine zentrale Stellung besitzt hierbei das Fibrinogen. Es wird in den Leberparenchymzellen synthetisiert. Seine Konzentration im menschlichen Plasma beträgt 200 - 400 mg/dl. Seine Halbwertszeit beträgt 2,4 - 4 Tage (21). Bei der elektrophoretischen Trennung der Plasmaproteine liegt Fibrinogen zwischen der β - und der τ -Globulin-Fraktion. Sein Molekulargewicht beträgt 340 KD (14). Die vollständige Primärstruktur ist bekannt (11,22,47,Abb.1-3).

Fibrinogen besteht aus dimer angeordneten identischen Hälften, die jeweils aus 3 Polypeptidketten bestehen (9). Diese werden durch Disulfidbrücken untereinander verbunden. Die 2 Hälften des Moleküls sind durch 3 Disulfidbrücken miteinander verknüpft (10,12). Insgesamt werden die 6 Peptidketten des Fibrinogens durch 29 Disulfidbrücken zusammengehalten (45,46). Das Molekül kann durch die Formel $(A\alpha, B\beta, \tau)_2$ wiedergegeben werden. In dieser Formel entspricht A dem Fibrinopeptid A (MW 1537) (64) am aminoterminalen Ende der α -Kette, und B einem etwa gleich großen Fibrinopeptid B (FPB) an der β -Kette. (Abb.1 und Abb.2)

Durch Einwirkung von Thrombin auf Fibrinogen werden die Fibrinopeptide A und B abgespalten (9), und es entsteht Fibrin mit der Struktur $(\alpha, \beta, \tau)_2$ (13,65). FPA ist deshalb ein guter Parameter für abgelaufene Thrombinaktivität (64). Durch Spaltung der Disulfidbrücken (z.B. nach Reduktion mit 2-Mercaptoäthanol) können die Polypeptidketten A α , B β und τ voneinander getrennt werden. (64) Mit Hilfe von Polyacrylamid-Elektrophoresen der Polypeptidketten in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS-PAGE) können für A α 64 KD, für B β 57 KD und für τ 48 KD ermittelt werden (13,32,81).

1959 entwerfen Hall und Slayter ein Modell des Fibrinogenmoleküls, dem die elektronenmikroskopischen Bilder der Autoren zugrunde liegen, und dem auch die Ergebnisse verschiedener physikochemischer Analysen weitgehend entsprechen. Danach hat das Fibrinogenmolekül eine Struktur ähnlich drei linear angeordneten Kugeln (65 Å, 50 Å, 65 Å), die durch dünne Verbindungsstege zusammenhängen. Für die Länge des Moleküls ergeben sich 475 ± 25 Å und für die Breite 50 - 70 Å (41). Dieses Modell wird mehrfach angezweifelt, und andere Formen werden angegeben, wie z.B. von Bachmann (1) eine zylindrische Form. In den letzten Jahren wird aber das ursprüngliche Modell von Hall und Slayter durch mehrere Autoren bestätigt und ist allgemein anerkannt (22,25,83,98).

N-terminales Ende

1
A D S G E G D F L A E G G G V R G P R V V I R H Q S A C K D S D W P F C S D E D
<----- Fibrinopeptid A ----->
16
W N Y K C P S G C R M K G L I D E V N Q D F T N R I N K L K N S L F E Y Q K N H
K D S H S L T T N I M E I L R G D F S A N N R D N T Y N R V S E D L R S R I E
V L K R K V I E K V Q H I Q L L Q K N V R A Q L V D M K R L E V D I D I K I R S
C R G S C S R A L A R E V D L K D Y E D Q Q K Q L E Q V I A K D L L P R S D R Q
H L F L I K M K E V P D L V P G N F K S Q L Q K V P P E W K A L T D M P Q M R M
220 230
<----- 6D ----->
241
E L E R P G G N E I T R G G S T S Y G T G S E T E S P R N P S S A G S W N S G G
<-----
S G P G G T G N R N P G S S G T G G T A T W K P G S S G P G S T G S W N S G S S
G T G S T G N Q N P G S P R P G S T G T W N P G S S E R G S A G H W T S E S S V
S G S T G Q W H S E S G S F R P D S P G S G N A R P N N P D W G T F E E V S G N
F-CB 3
V S P G T R R E Y H T E K L V T S K G D K E L R T G X E K V T S G S T T T T R R
S C S K T V T K T V I G P D G H K E V T K E V V T S E D G S D C P E A M D L G T
477
>
L S G I G T L D G F R H R H P D E A A F F D T A S T G K T F P G F F S P M L G E
F V S E T E S R G S E S G I F T N T K E S S S H H P G I A E E P S R G K S S S Y
S K Q F T S S T S Y N R G D S T F E S K S Y K M A D E A G S E A D H E G T H S T
K R G H A K S R P V
611 (C-terminales Ende)

Abb.1: Aminosäuresequenz der Aa-Kette des Fibrinogenmoleküls. Das Fibrinopeptid A, das Plasmin-induzierte Bruchstück 6D und das F-CB 3 sind markiert.

N-terminales Ende
 1 13 30
 ZGVNDNEEGFFSARGHRPLDKKREEAPSLRPAPPPISGGG
 <— Fibrinopeptid B —> <— EIF —>
 <— EIF —>
 43 47
 YRARPAKAAATQKKVERKAPDAGGCLHADPDLGVLCPTGC
 —>
 —>
 <— 6A —>
 LKDLWQKRQKQVKDNENVVNEYSSSELEKHQLYIDETVNSN

 IPTNLRVLR SILENLR SKIQKLES DVSAQMEYCRTPCTVS

 CNIPVVS GKECEEIIRKGGETSEMYLIQPDSSVKPYRVYC

 DMNTENG GWTVIQNRQDGSVD FGRKWD PYKQGF GNVATNT

 DGKNYC GLPG EYWL GNDKISQLTRMGPT ELLIEM EDWKGD

 KVKAHYGGFTVKNEANKYQISVNKYRG TAGNALMDGASQL

 MGENRTMTIHNGMFFSTYDRDNDGWLTS DPRKQCSKEDGG

 GWWYNRCHAANPNGRYYWGGWYTWDMAKHGTDG GVVWMNW

 KGSWYSMRKMSMKIRPPFPQQ
 461
 C-terminales Ende

Abb.2: Aminosäuresequenz der B β -Kette des Fibrinogenmoleküls. Das Fibrinopeptid B, die Elastase-induzierten Bruchstücke (EIF) Pos. 13-43 und Pos. 30-43 sowie das Plasmin-induzierte Bruchstück 6A sind markiert.

N-terminales Ende

```

1
YVATRDNCCILDERFGSYCPTTCGIADFLST'QTKVNKDL
      54      58
      TS EVKQLIKAIQLTYNPDSSKPNMID
      (- 6E ->)
AATLKSRKMLEEIMKYEASILTHDSSIRYLQEIYNSNNQK
IVNLKEKVAQLEEQCQEPCKDTVQIHDITGKDCQDIANKK
AKQSGLYFIKPLKANQQFLVYCEIDGSGNGWTVFQKRLDG
SVDFKKNWIQYKEGFGHLSPTGTTEFWLGNEKIHLISTQS
AIPYALRVELEDWNGRTSRADYAMFKVGP EADKYRLTYAY
FAGGDAGDAFDGFDGDDPSDKFFTSHNGMQFSTWDNDND
KFEGNCAEQDGSQWWMNKCHAGHLNGVYYQGGTYSKASTP
NGYDNGI IWATWKTRWYSMKKTTMKII PFNRLTIGEGQH
Quervernetzung zu 398
      ||
HLGGAKQAGDV
      406      411
      C-terminales Ende
Quervernetzung zu 406
      ||

```

Abb.3: Aminosäuresequenz der α -Kette des Fibrinogenmoleküls. Das Plasmin-induzierte Bruchstück 6E sowie die Bereiche der Quervernetzung im Fibrinmolekül sind markiert.

2.4. BLUTGERINNUNG

Die Umwandlung des im Plasma gelöst vorliegenden Fibrinogens in Fibrin erfolgt durch thrombininduzierte limitierte Proteolyse des Fibrinogens. Thrombin wird durch die Gerinnungskaskade, entweder über das Intrinsic oder über das Extrinsic System, aktiviert (Abb.5).

Bei der limitierten Proteolyse von Fibrinogen werden von der A α -Kette das FPA (Abb.1) und von der B β -Kette das FPB (Abb.2) abgespalten. Die dabei entstehenden Fibrinmonomere lagern sich zu Polymeren. Es entsteht lösliches Fibrin. Thrombin aktiviert gleichzeitig Faktor XIII. Diese Transglutaminase führt zur Ausbildung von Proteinbindungen (Abb.4) im τ -Kettenbereich, die schließlich zur Quervernetzung der Fibrinmonomere im Bereich der α - und τ -Kette führt (107).

Im Plasma existieren Proteinaseinhibitoren. Die wichtigsten Inhibitoren für die Serinproteasen der Gerinnungskaskade sind neben Antithrombin III (AT-III) α_2 -Macroglobulin und α_1 -Antitrypsin (55).

AT-III ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 62 KD und einer Plasmakonzentration von 0,3 g/l. AT-III wird hauptsächlich in der Leber produziert. Seine Halbwertszeit beträgt 3 Tage. AT-III neutralisiert die aktivierten Serinproteasen IIa (Thrombin), Xa (Stuart), IXa (Christmas), XIa (Plasmathromboplastin), XIIa (Hageman) und Kallikrein durch Bildung von inaktiven Komplexen mit diesen Faktoren.

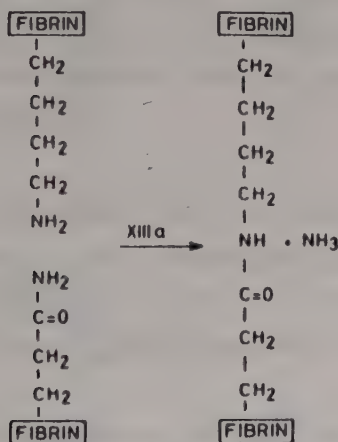


Abb.4: Schema der kovalenten Quervernetzungsreaktion zwischen Glutamin und Lysin bei der Faktor XIIIa-katalysierten Fibrinquervernetzung.

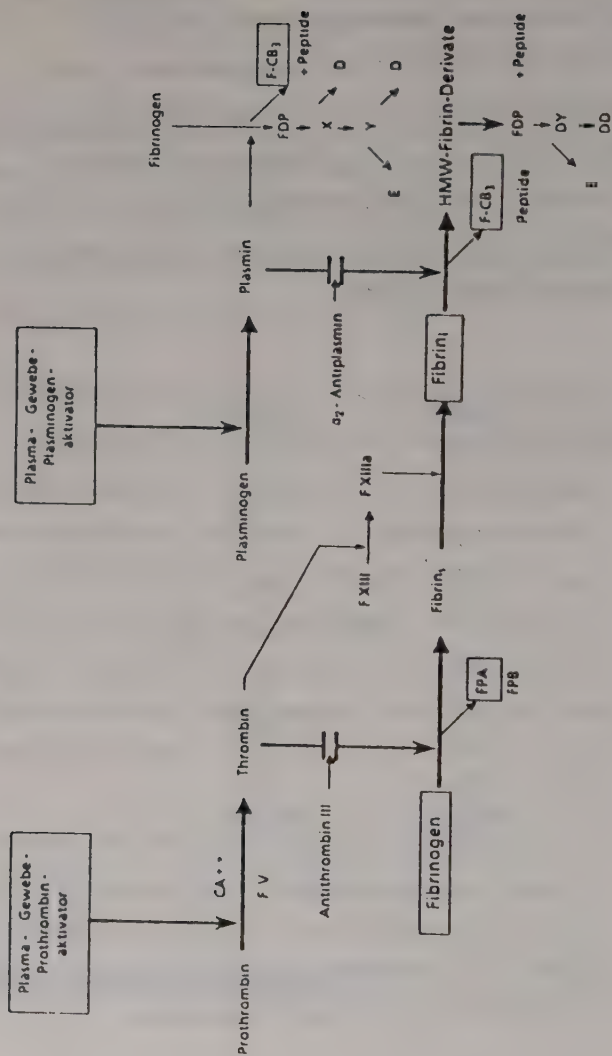


Abb. 5: Schema der Koagulation und der Fibrinogenolyse

2.5. FIBRINOLYSE UND FIBRINOGENOLYSE

Der Abbau von Fibrin(ogen) erfolgt in vivo überwiegend durch die Serinprotease Plasmin (Abb.6). Neben diesem klassischen fibrino(geno)lytischen Abbau existieren noch andere Wege der Fibrino(geno)lyse; dabei spielt die Elastase als sogenannter "alternative pathway" eine wichtige Rolle (61,84-86).

Plasmin wird ähnlich dem System der Blutgerinnung durch Aktivierung über ein Extrinsic oder Intrinsic System aus dem inaktiven Vorläuferprotein Plasminogen (MW 85 KD) hergestellt (51,62,103).

Der Abbau von Fibrin(ogen) beginnt im besonders exponierten Molekülbereich: im C-terminalen Ende der α -Kette (7) und im N-terminalen Ende der β -Kette. Dabei entstehen Abbauprodukte mit einem MW zwischen 19 und 45 KD (53,Abb.1 und 2).

Dabei anfallende Spaltprodukte können mit dem F-CB 3-verwandten Antigen erfaßt werden. F-CB 3 ist deshalb ein Parameter, mit dem sich gut bereits frühe Fibrino(geno)lyse zeigen läßt (33).

Neben dem F-CB3 fallen beim Abbau der α -Kette weitere Bruchstücke an (Abb.1). Von diesen Fibrinogenbruchstücken wurde das dem F-CB 3 naheliegende α -Kettenbruchstück (Pos. 220-230) 6D (Abb.1) sowie ein Bruchstück vom N-terminalen Ende der β -Kette (Pos. 43-47) 6A (Abb.2) von SALDEEN et al identifiziert, sequenziert, nachsynthetisiert, und im Tierversuch ihre biologische Wirkung untersucht (92,93). Protein 6A führt zu einer Erhöhung der Permeabilität der Lunge für Proteine und einer Vasodilatation. Protein 6D löst ein Lungenödem aus. Beiden gemeinsam ist eine Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität, eine Verstärkung der Bradykininwirkung sowie eine cytotoxische Wirkung auf Kaninchenzellen.

Ähnliches gilt auch für die Elastase-induzierten Fibrinogenbruchstücke B β 13-43 und B β 30-43.(93, Abb.2)

Durch die Fibrinogenolyse der α -Kette wird Fibrinogen (MW 340 KD) über leicht abgebautes Fibrinogen (300 KD) zu den Bruchstücken Prä-X (MW 280 KD) und X (MW 240 KD) abgebaut. Durch weitere Proteolyse entstehen Fragment D (MW 95 KD) und Fragment Y (MW 155 KD). Das Y kann in ein weiteres D und in die Kernregion E (MW 50 KD) gespalten werden, so daß aus einem Molekül Fibrinogen schließlich 2 Moleküle D und ein Molekül E entstehen können (13,26, 29,52,56,58,59,81,82,Abb.6). Aufgrund unterschiedlicher

Spaltung entstehen verschieden große Bruchstücke D (MW 80-100 KD) (27,28,83).

Fragment X und seine Vorstufen sind überwiegend noch gerinnungsfähig (13). Die Fibrinogenspaltprodukte Y, D und E besitzen ihrerseits antikoagulatorische Wirkung.

(5,83)

Die kovalente Quervernetzung von Fibrinketten führt bei der Fibrinolyse zu hochmolekularen Abbauprodukten (X-Oligomere)(34).

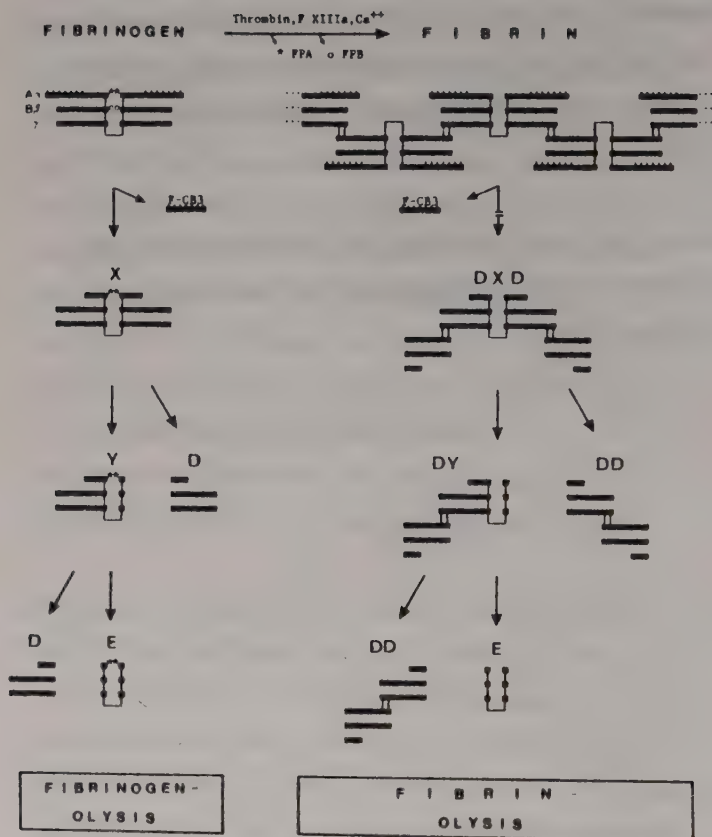


Abb.6: Parallele Darstellung der Plasmin-induzierten Fibrinogenolyse und Fibrinolyse.

3. MATERIAL UND METHODIK

3.1. UNTERSUCHUNGSMATERIAL:

Untersucht werden 20 Vollblutkonserven im Lagerungsverlauf über 39 Tage und 20 fresh frozen plasma.

Bei den Vollblutkonserven handelt es sich um CPDA-1-Konserven. 500 ml Blut werden nach der Entnahme mit 70ml Stabilisator versetzt.

100 ml Stabilisator enthalten:

300 mg Zitronensäure

2,63 g Natriumcitrat

2,9 g Glucose

251 mg Natriumdihydrogenphosphat

27,5 mg Adenin

Aqua ad injectabile ad 100 ml

Die Blutkonserven werden im Transfusionszentrum bei 4°C gelagert.

Die FFPs haben ein durchschnittliches Alter von 4 Monaten. Direkt nach der Herstellung wird 83 ml Plasma mit 18 ml CPD-Stabilisator versetzt. Die Lagerung erfolgt bei -70°C.

3.2. ENTNAHMETECHNIK UND VERARBEITUNG DER PROBEN

Aus den Vollblutkonserven werden unter sterilen Bedingungen an den Tagen $\frac{1}{2}$, 2, 4, 6, 8, 11, 18, 25, 32 und 39 Proben entnommen. Nach vorheriger Kopfüberrotation zu gleichmäßigen Vermischung des Blutes erfolgt die Abnahme mit einem Anticoagulans im Verhältnis 1:9.

Als Anticoagulans werden verwendet:

- 1.) Natriumcitratlösung, 3,13%.
- 2.) 0,13 mol tri-Ma-citrat-2-hydrat, 0,06 mol TES, 0,05 mol EDTA, 1000 KIE/ml Aprotinin, pH 7,4.

Anschließend werden die Proben zentrifugiert und das Plasma bei -40°C eingefroren.

Die FFPs werden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und Proben in gleicher Weise entnommen und verarbeitet.

Beim Vergleich der in den Proben gemessenen Werte mit den im Plasma üblichen Normalwerten ist zu berücksichtigen, daß wegen der Verdünnung der Vollblutkonserve durch CPDA-Stabilisator wie auch wegen der Versetzung der Proben mit Anticoagulans insgesamt eine Plasmaverdünnung von ca 20% erfolgt. Beim FFP beträgt dieser Faktor ca 30%.

3.3. FIBRINOGEN (GERINNBARES PROTEIN)

Das Fibrinogen wird in Anlehnung an Blombäck in einer Modifikation von Hafter und Graeff (38) durch Überführung mit Thrombin in ein Gerinnsel bestimmt. Jeweils 0,5 ml Plasma wird mit 0,1 ml Aprotinin (1000 KIE Trasylol), 0,1 ml Kalziumchlorid (0.025 M/l), 0,2 ml 0.9% Natriumchlorid und 0,1 ml Topostasin (60 IE Thrombin) versetzt.

Nach einer 20minütigen Inkubation im Wasserbad mit 37°C wird das entstandene Gerinnsel ausgepresst, zweimal in 0,9% NaCl gewaschen und in 5 ml einer alkalischen (5 M Harnstoff, 0,2 N NaOH) Harnstofflösung gelöst.

Anschließend wird die Extinktion bei 280 nm und 325 nm in 1 cm Quarzküvetten gemessen, die unspezifische Extinktion (325 nm) subtrahiert und durch Multiplikation mit dem Faktor 6,918 (39) die Menge an gerinnbarem Protein in mg/dl errechnet.

Mit dieser Methode werden alle gerinnbaren Proteine, also neben dem Fibrinogen (340 kD) auch geringfügig abgebautes Fibrinogen (320 kD, 300 kD), prä-X (280 kD) sowie der überwiegende Anteil des frühen Fibrinogenabbauproduktes X (MW = 240 kD) erfaßt.

Die im Rahmen dieser Methode gewonnenen Serumproben werden für die F-CB3-Bestimmungen aufbewahrt.

3.4. LASER-NEPHELOMETRIE (LN)

Bei der LN wird das Prinzip der AG-AK-Komplexbildung in Lösung ausgenutzt. Aus der Intensität der Streuung eines Laserstrahls an den AG-AK-Komplexen kann mit Hilfe einer Standardkurve die AG-Konzentration in der Probe ermittelt werden (58). Da zu diesen Bestimmungen ein möglichst klares Plasma verwendet werden muß, werden die jeweiligen Proben zunächst mit dem Klärungsmittel Lipo-clean (Behringwerke) behandelt. Als Verdünnungsmedium wird sterile isotone Kochsalzlösung verwendet.

Voraussetzung für reproduzierbare Werte ist, daß Antigen und Antikörper in einem solchen Verhältnis gemischt werden, daß man sich immer im ansteigenden Schenkel einer Heidelberger Kurve, also im Bereich eines geringen Antikörperüberschusses befindet. Zur Bestimmung werden das Lasernephelometer, Antiseren und Standardplasmen der Firma Behring verwendet. Die Auswertung erfolgt über einen Rechner der Firma Hewlett Packard, der über ein Interface mit dem Nephelometer verbunden wird.

Folgende Proteine werden mit der LN bestimmt:

α 1-Antitrypsin, α 2-Macroglobulin, C3c, C4.

3.5. ANTITHROMBIN III (AT-III)

Zur Bestimmung benutzen wir den Test-Kit von Boehringer Mannheim. Er beruht auf dem Prinzip der Bestimmung eines chromogenen Substrates als Zweipunktmessung bei 37°C.

Zunächst wird AT-III durch Heparin aktiviert:

$\text{AT-III} + \text{Heparin} \rightarrow (\text{AT-III} \cdot \text{Heparin})$

Thrombin, das an den AT-III-Heparin-Komplex bindet, wird im Überschuß zugegeben:

$(\text{AT-III} \cdot \text{Heparin}) + \text{Thrombinüberschuß} \rightarrow$

$(\text{AT-III} \cdot \text{Heparin} \cdot \text{Thrombin}) + \text{Thrombinrest}$

Der Thrombinrest wird nach einer gewissen Inkubationszeit mit Hilfe eines chromogenen Substrates bestimmt:

$\text{Tos-Gly-Pro-Arg-pNa} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{Thrombinrest}}$

$\text{Tos-Gly-Pro-Arg-OH} + \text{p-Na}$

Zum Abstoppen dieser Reaktion wird 20%ige Essigsäure verwendet. Die Extinktion wird bei 405 nm im Spectrophotometer Mod. 35 der Fa. Beckman gemessen.

Der Normalbereich liegt bei 80% - 120% oder bei 20-29 IU/ml bei 37°C. Zur Qualitätskontrolle werden die Kontrollseren PreciChrom I bzw. PreciChrom II der Fa. Boehringer Mannheim mitbestimmt.

3.6. ELASTASE

Die Elastase wird mittels eines Elisa (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay) der Fa. Merck bestimmt. Dabei wird der Komplex aus dem Enzym mit seinem wichtigsten physiologischen Inaktivator, dem α -1-Antitrypsin, der die Elastase nach ihrer Freisetzung sofort zu 90% bindet (27), gemessen.

Zur Verwendung kommen Polystyrol-Röhrchen, die mit Antikörper vom Schaf gegen humane Granulozyten-Elastase beschichtet sind. Von diesen Antikörpern wird der in der Probe vorhandene Komplex mit seinem PMN-Elastase-Teil gebunden. Durch Abgießen des Überstandes und Waschen der Kunststoffröhrchen mit einer speziellen Waschlösung werden die übrigen Probenanteile nach einer bestimmten Inkubationszeit abgetrennt. Danach werden enzymmarkierte Antikörper gegen α -1-Antitrypsin zugegeben. Sie binden an die antigenen Determinanten des α 1-Antitrypsin im Komplex am Röhrchen.

Markierungsenzym ist die alkalische Phosphatase. Nach Auswaschen der überschüssigen enzymmarkierten Antikörper bestimmt man die enzymatische Aktivität des Antikörper-Enzym-Konjugates am Röhrchen. Substrat hierbei ist 4-Nitrophenylphosphat.

Durch Zusatz von Natronlauge (2 mol/l) wird die Hydrolyse des Substrates unterbrochen. Die Farbintensität des Reaktionsgemisches wird bei 405 nm im Photometer bestimmt. Sie ist der Konzentration des PMN-Elastase- α 1-Antitrypsinkomplexes in der Probe proportional. Die PMN-Elastase-Konzentration wird aus einer mit Hilfe von Standards erstellten Eichkurve ermittelt.

Zur Qualitätskontrolle wird das der Testpackung beige-fügte Kontrollplasma verwendet.

3.7. FIBRINOPEPTID A (FPA)

Das Fibrinopeptid A wird nach einem von Nossel entwickelten RIA (63,64) aus Plasma bestimmt, wobei das Fibrinogen durch Adsorption an Bentonit entfernt wird. (RIA der Fa. Byk Mallinkrodt) Die Werte von gesunden Probanden liegen damit bei uns unter 5 ng/ml.

Die mit Bentonit vorbehandelten Plasmaproben werden mit 125 I-markiertem Fibrinopeptid A versetzt, welches dann im ersten Reaktionsschritt mit dem im Plasma vorhandenen unmarkierten FPA um die Bindungsstellen des zugesetzten spezifischen Antikörpers konkurriert.

Als Ergebnis dieser Konkurrenz nimmt die Radioaktivität des Antigen-Antikörperkomplexes in gleicher Weise ab, wie die Konzentration der unmarkierten, nachzuweisenden FPAs zunimmt. Das an den Antikörper gebundene 125-J-FPA wird dann mit Hilfe einer zweiten Antikörper-Polyethylen-glycollösung von überschüssigem freiem 125-J-FPA abgetrennt und die Aktivität mit einem Gammazintillationszähler bestimmt. Die Plasmakonzentration von FPA wird über eine Standardkurve ermittelt, die aus mitgelieferten Standards erstellt wird.

3.8. FRÜHES α -KETTENBRUCHSTÜCK F-CB 3

Das F-CB 3 verwandte Antigen wird mit Hilfe eines RIA bestimmt.(33) Der Antikörper wird von Frau Dr. Gollwitzer, Max-Planck-Institut für Biochemie, München-Martinsried zur Verfügung gestellt. Die Markierung des AK erfolgt mittels der Laktat Peroxydase Methode. Die Aktivität wird mit einem Gammazintillationszähler gemessen und die Konzentration von F-CB 3 über eine Standardkurve ermittelt, die vorher aus Standards erstellt wird. Die Normalwerte im Serum liegen unter 20 pM/l.

3.9. IMMUNADSORPTION

Fibrinogenantikörper der Fa. Behring werden gemäß Firmenvorschrift kovalent an Bromcyanaktivierte Sepharose 4B (Pharmacia) gekoppelt. Zur Koppelung werden folgende Lösungen benötigt:

Waschlösung: 1mM HCL (200 ml/g)

Koppelpuffer: 0,1 M NaHCO₃ mit 0,5 M NaCl (ph 8,3)

zum Abblocken: 0,2 M Glycin (pH 8,0)

Acetatpuffer: 0,1 M Essigsäure, 0,1 M Natriumacetat (pH 4)

Die gefriergetrocknete CNBr-aktivierte Sepharose 4B wird zunächst mit 1mM HCl aufgeschwemmt. Danach wird dem Fibrinogen-Antikörper Koppelpuffer zugesetzt und somit an die Sepharose gekoppelt. Noch freie aktive Gruppen der Sepharose werden mit Glycin besetzt. Fünfmaliges abwechselndes Waschen mit Koppelpuffer (pH 8,3) und Acetatpuffer (pH 4) entfernt die nicht gebundenen Proteine. Das so erhaltene Gel wird in folgendem Puffer aufbewahrt: 0,02 M Natriumphosphatpuffer, 0,65 M NaCl, 0,02% Natriumacid.

0,5 ml Plasma werden mit 5 ml 0,9% NaCl und 0,5 ml Sepharose-Antikörper-Gel versetzt und 30 Minuten kopf-über rotiert. Nach zweimaligem Waschen mit 0,9% NaCl wird das an den Sepharose-Antikörper gebundene Fibrinogenmaterial mit 0,4 ml 2% SDS-Lösung in 8M Harnstoff aus der Antigen-Antikörper-Bindung freigesetzt.

3.10. REDUKTIVE SPALTUNG

Ein Teil der Proben wird zur reduktiven Spaltung der Disulfidbrücken mit Mercaptoäthanol versetzt und für 20 Minuten bei 60°C inkubiert.

3.11. ELEKTROPHORESENANSATZ (SDS-PAGE)

Zur weiteren analytischen Charakterisierung der gefällten Fibrinderivate werden SDS-Polyacrylamid-Elektrophoresen nach Weber und Osborn durchgeführt (106). Entsprechend der von Furthmayr und Timpl (30) modifizierten Methode von Shapiro et al. (96) werden 7,5% (reduzierte Proben) und 4% Gele mit 0.1M Phosphatpuffer (pH 7.2) und 0.1% SDS zur Trennung verwendet.

Lösung A (Gelansatz):

für 4% Gele werden in 50 ml Phosphatpuffer (pH 7,2) 8 g Acrylamid und 0,31 g DATD und 0,2 g SDS gelöst, 0,2 ml TEMED (N,N,N,N-tetra-methylethylendiamin) zugegeben und mit Aqua dest. auf 100 ml verdünnt.

Für 7,5% Gele werden in 50 ml Phosphatpuffer pH 7,2 15 g Acrylamid und 400 mg Methylenbisacrylamid sowie 0,2 g SDS und 0,2 ml TEMED gelöst und mit Aqua dest. auf 100 ml verdünnt.

Lösung B (Polymerisator): In 100 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,2 werden 150 mg Ammoniumpersulfat gelöst.

Lösung A und B werden im Verhältnis 1:1 gemischt, sofort in Glasröhrchen (6x100 mm) überführt, mit Aqua dest. überschichtet und mehrere Stunden bei Raumtemperatur zum Auspolymerisieren aufbewahrt. Die elektrophoretische Trennung wird mit 5mA/Gel über 10 bis 12 Stunden durchgeführt. Als Laufpuffer wird ein 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,2 verwendet.

3.12. FÄRBEN DER GELE

Die Gele werden in dem Proteinfarbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 gefärbt. (6) Der Lösungsansatz besteht aus 0,4 g Coomassie Blue G-250 gelöst in einer Mischung (1:1) von je 250 ml Methanol und 7% Essigsäure. Die Entfärbung der Gele erfolgt in 7% Essigsäure.

3.13. DENSITOMETRISCHE AUSWERTUNG

Die densitometrische Auswertung erfolgt mit dem Laserdensitometer 2020 der Fa. LKB.

3.14. BESTIMMUNG DER MOLEKULARGEWICHTE

Da homologe Proteine im elektrischen Feld in Gegenwart von Natrium-Dodecylsulfat (SDS) proportional zu ihrem Molekulargewicht wandern, ergibt sich bei halblogarithmischer Auftragung eine lineare Abhängigkeit zwischen der in der Elektrophorese zurückgelegten Wanderungsstrecke und dem Molekulargewicht. Als Referenzproteine wählten wir Fibrinogen der Fa. Farmacia sowie käufliche Referenzproteine.

Verwendet man in den Densitometerkurven der elektro-phoretischen Auftrennungen die in der Elektrophorese zurückgelegten Wegstrecken dieser Referenzproteine und ihre bekannten Molekulargewichte als Eichwerte, so kann man die Schnittpunkte durch eine Gerade verbinden. Aus den Schnittpunkten der Wanderungsstrecke der zu bestimmenden unbekannten Derivate mit dieser Geraden können deren Molekulargewichte ermittelt werden.

3.15. STATISTISCHE AUSWERTUNG:

Es werden die Mittelwerte und die einfachen Standardabweichungen der Probenwerte berechnet.

Zur Entscheidung, welcher Zusammenhang zwischen zwei Variablen besteht (Abb.12), wird die Korrelationsstatistik verwendet. Um eine Aussage über den gefundenen Korrelationskoeffizienten machen zu können, wird die Signifikanz des Koeffizienten nach E.WEBER geprüft.

4. ERGEBNISSE

	Fibrinogen 200-400 mg/dl	FPA < 6 ng/ml	AT III Aktivität 80%-120%	F-CB3 < 40 ng/ml	α -zu $\alpha\beta$ - Kettenan- teil in %	Elastase 60 - 110 μ g/l
Tag 1	243 $\pm$ 43	7,7 $\pm$ 3	73,0 $\pm$ 7,7	70,7 $\pm$ 16,4	34,7 $\pm$ 2,5	92 $\pm$ 41
Tag 2	252 $\pm$ 60	n.d.	73,8 $\pm$ 5,9	104,1 $\pm$ 35,5	n.d.	95 $\pm$ 44
Tag 4	252 $\pm$ 63	7,0 $\pm$ 2	74,5 $\pm$ 5,5	125,6 $\pm$ 55,8	31,8 $\pm$ 3,6	133 $\pm$ 54
Tag 6	243 $\pm$ 46	n.d.	74,8 $\pm$ 9,8	158,4 $\pm$ 35,9	n.d.	269 $\pm$ 166
Tag 8	236 $\pm$ 49	7,7 $\pm$ 2	74,4 $\pm$ 4,0	141,3 $\pm$ 34,2	31,0 $\pm$ 2,8	504 $\pm$ 388
Tag 11	247 $\pm$ 57	n.d.	74,5 $\pm$ 11,3	146,1 $\pm$ 59,8	n.d.	859 $\pm$ 558
Tag 18	263 $\pm$ 53	7,8 $\pm$ 4	73,2 $\pm$ 10,9	161,4 $\pm$ 43,8	28,2 $\pm$ 2,1	1687 $\pm$ 684
Tag 25	242 $\pm$ 50	n.d.	74,6 $\pm$ 5,5	186,8 $\pm$ 53,8	28,0 $\pm$ 3,9	2355 $\pm$ 833
Tag 32	237 $\pm$ 57	n.d.	70,0 $\pm$ 9,1	303,0 $\pm$ 189	25,3 $\pm$ 4,5	2972 $\pm$ 919
Tag 39	222 $\pm$ 36	18,5 $\pm$ 6,4	n.d.	356,3 $\pm$ 110	n.d.	3492 $\pm$ 954

Tab.1: Fibrinogen (gerinnbares Protein), Fibrinopeptid A (FPA), Antithrombin III- Aktivität (AT III), Fibrino-Cyano-Bromid-Bruchstück 3 verwandtes Antigen (F-CB3), % Anteil der $\alpha\alpha$ -Kette zur Gesamtmenge der $\alpha\alpha$, $\beta\beta$ und τ -Ketten sowie PNM-Elastasekonzentration gemessen in 20 Vollblutkonserven im Verlauf einer Lagerung über 39 Tage unter normalen Blutbankbedingungen bei 4°C.

	α -1-AT mg/dl	α -2-Macro mg/dl	C3-c mg/dl	C4 mg/dl
Tag 1	96,3 $\pm$ 21,7	79,2 $\pm$ 16,8	39,0 $\pm$ 8,2	27,1 $\pm$ 5,97
Tag 2	99,1 $\pm$ 6,4	78,7 $\pm$ 10,0	46,3 $\pm$ 10,6	27,4 $\pm$ 6,2
Tag 4	98,9 $\pm$ 19,2	78,3 $\pm$ 10,1	46,9 $\pm$ 11,6	26,5 $\pm$ 5,1
Tag 6	104,2 $\pm$ 23,1	78,4 $\pm$ 10,4	45,5 $\pm$ 14,8	25,9 $\pm$ 4,2
Tag 8	86,8 $\pm$ 23,8	76,2 $\pm$ 13,4	44,7 $\pm$ 3,4	23,1 $\pm$ 4,4
Tag 11	108,6 $\pm$ 17,4	80,2 $\pm$ 8,3	44,1 $\pm$ 10,0	26,7 $\pm$ 5,2
Tag 18	98,9 $\pm$ 22,4	79,4 $\pm$ 12,2	43,5 $\pm$ 6,0	28,4 $\pm$ 4,2
Tag 25	95,8 $\pm$ 10,9	78,8 $\pm$ 13,6	42,6 $\pm$ 11,3	28,6 $\pm$ 3,5
Tag 32	100,2 $\pm$ 18,2	78,3 $\pm$ 18,3	43,4 $\pm$ 11,0	29,6 $\pm$ 3,7
Tag 39	100,9 $\pm$ 16,3	81,7 $\pm$ 10,3	43,5 $\pm$ 6,6	29,0 $\pm$ 6,2

Tab.2: Proteinaseinhibitor α -1-Antitrypsin, Proteinaseinhibitor α -2-Makroglobulin, Complement C3-c, Complement C4 sowie Protein C Konzentration gemessen in 20 Vollblutkonserven im Verlauf einer Lagerung über 39 Tage unter normalen Blutbankbedingungen bei 4° C.

4.1. VOLLBLUTKONSERVEN

4.1.1. FIBRINOGEN

Im Verlauf der Lagerung zeigt sich eine Abnahme der Fibrinogenkonzentration des Vollbluts von 243 ± 53 mg/dl (Tag $\frac{1}{2}$) über 236 ± 49 (Tag 8) auf 222 ± 36 mg/dl (Tag 39). Das Ausmaß dieser Konzentrationsänderung ist nicht signifikant. (Tab.1, Abb.7)

4.1.2. FIBRINOPEPTID A

Die FPA-Konzentration liegt bei der $\frac{1}{2}$ Tag alten Konserve mit $7,7 \pm 3$ ng/ml im oberen Normbereich. Bis zum Tag 18 findet keine Konzentrationsänderung statt. Von Tag 18 bis Tag 39 steigt FPA geringfügig von $7,8 \pm 4$ ng/ml auf $18,5 \pm 6,4$ ng/ml an. (Tab.1, Abb.8)

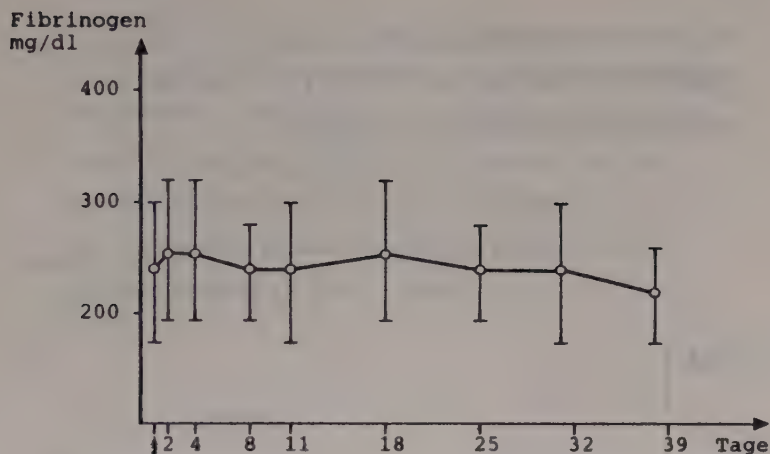


Abb.7: Fibrinogenkonzentration (gerinnbares Protein) in Vollblutkonserven im Lagerungsverlauf über 39 Tage.

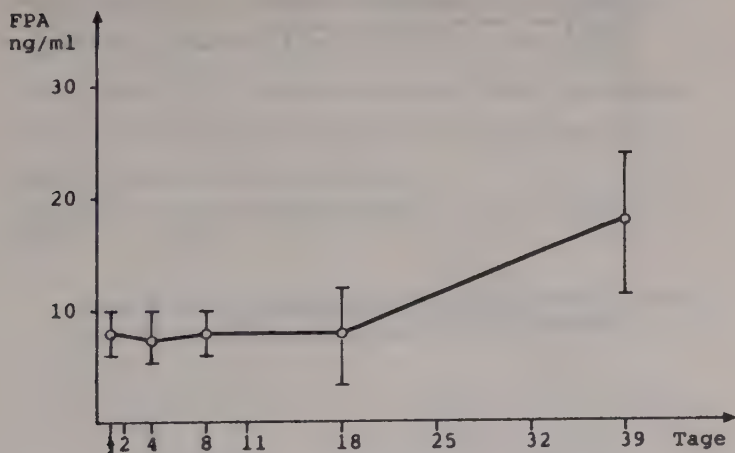


Abb.8: Fibrinopeptid A-Konzentration in Vollblutkonserven im Lagerungsverlauf über 39 Tage.

4.1.3. ANTITHROMBIN-III

Die AT-III-Aktivität zeigt mit Werten von $73,0 \pm 7,7\%$ (Tag 2), $74,4 \pm 4,0\%$ (Tag 8) und $70,0 \pm 9,1\%$ (Tag 32) keinen Aktivitätsverlust. (Tab.1, Abb.9)

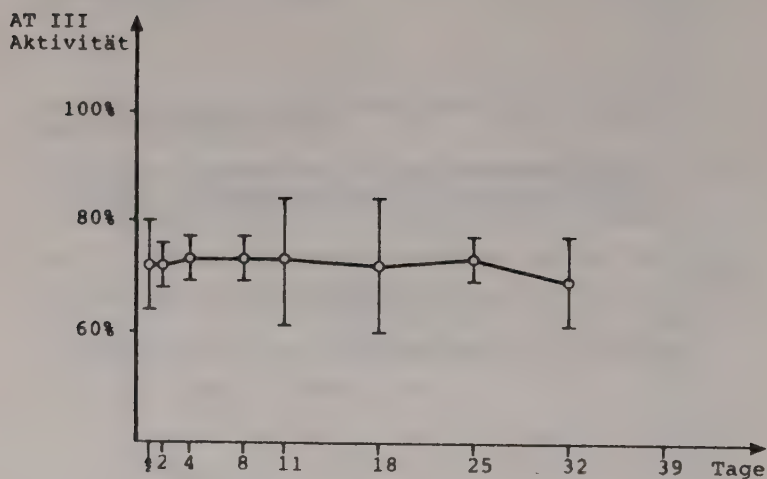


Abb.9: Antithrombin-III-Konzentration (AT-III) in Vollblutkonserven im Lagerungsverlauf über 39 Tage.

4.1.4. F-CB 3

F-CB 3 zeigt einen ausgeprägten, mit der Lagerungsdauer zunehmenden Anstieg. Dieser ist von Tag $\frac{1}{2}$ ($70,7 \pm 16,4$ pmol/ml) über Tag 4 ($125,6 \pm 55,8$ pmol/ml) bis Tag 8 ($141,3 \pm 34,2$ pmol/ml) nur gering und nimmt dann von Tag 25 ($186,8 \pm 43,8$ pmol/ml) bis Tag 39 ($356,3 \pm 110$ pmol/ml) deutlich zu (Tab.1, Abb.10).

4.1.5. ELASTASE

Die Elastasekonzentration steigt während der Lagerung kontinuierlich von normalen Ausgangswerten mit 92 ± 41 µg/l (Tag $\frac{1}{2}$) über 133 ± 54 µg/l (Tag 4), 504 ± 388 µg/l (Tag 8), 1687 ± 684 µg/l (Tag 18), 2355 ± 822 µg/l (Tag 25) und 2972 ± 919 µg/l (Tag 32) bis auf 3492 ± 954 µg/l (Tag 39) an. (Tab.1, Abb.11)

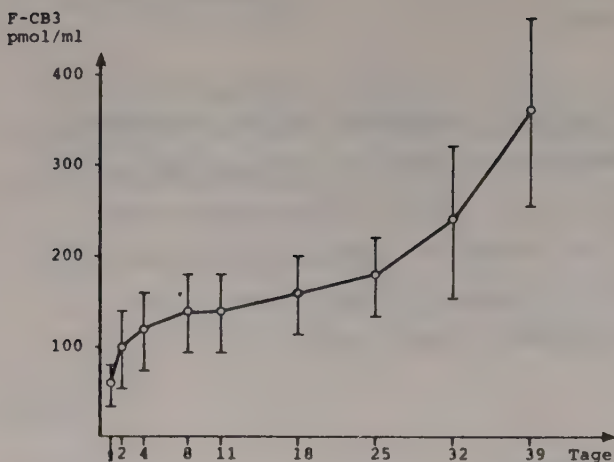


Abb.10: F-CB 3-Konzentration in Vollblutkonserven im Lagerungsverlauf über 39 Tage.

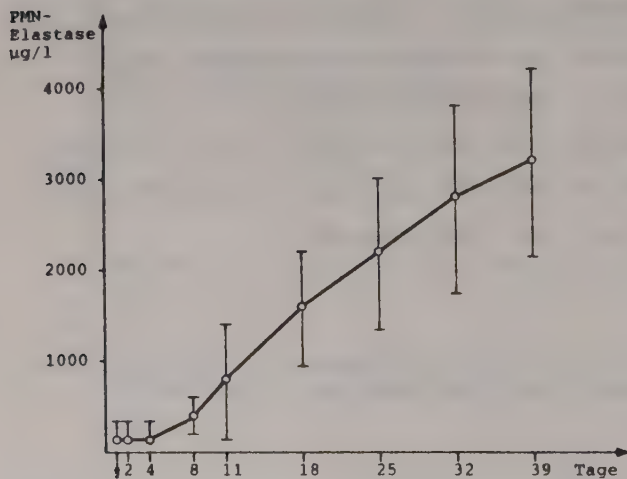


Abb.11: Elastase-Konzentration in Vollblutkonserven im Lagerungsverlauf über 39 Tage.

4.1.6. KORRELATION ZWISCHEN ELASTASE-UND

F-CB 3-KONZENTRATIONEN

Zwischen dem Anstieg der Elastase und dem F-CB 3 im Lagerungsverlauf der Vollblutkonserve besteht grosse Ähnlichkeit. Sie findet ihren Ausdruck in einer guten Korrelation beim Vergleich der Einzelwerte der beiden Parameter ($r = 0,73, n = 180, p < 0,001.$) (Abb.12).

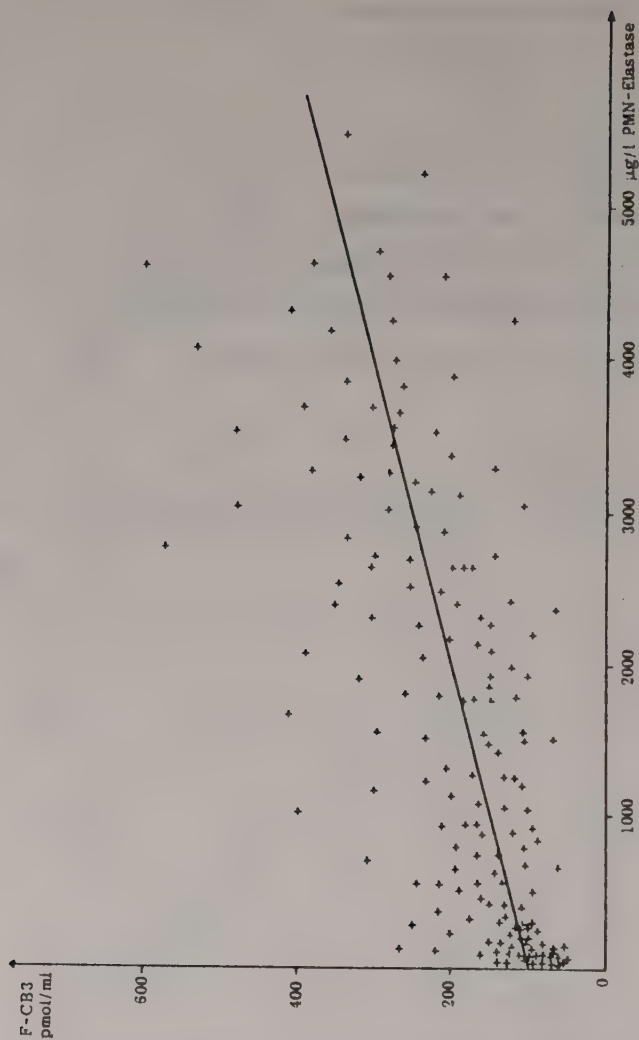


Abb.12: Korrelation der Konzentration von PMN-Elastase und F-CB 3
in 1 bis 39 Tage alten Vollblutkonserven

4.1.7. α -1-ANTITRYPSIN UND α -2-MACROGLOBULIN

Die Konzentrationen der beiden Elastaseinhibitoren α -1-Antitrypsin und α -2-Macroglobulin bleiben im Laufe der Lagerung weitgehend konstant. (Tab.2)

α -1-Antitrypsin weist Konzentrationen von $96,3 \pm 21,7$ mg/dl (Tag 1), $86,8 \pm 23,8$ mg/dl (Tag 8) und $100,9 \pm 16,3$ mg/dl (Tag 39) auf.

Die Werte für α -2-Macroglobulin betragen $79,2 \pm 16,8$ mg/dl (Tag 1), $76,2 \pm 13,4$ mg/dl (Tag 8) und $81,7 \pm 10,3$ mg/dl (Tag 39).

4.1.8. COMPLEMENTSYSTEM, C3c UND C4

Die Konzentration der beiden Proteine C3c und C4 bleibt weitgehend konstant (Tab.2).

C3c weist Konzentrationen von $39,0 \pm 8,2$ mg/dl (Tag 1), $44,7 \pm 3,4$ mg/dl (Tag 8) und $43,5 \pm 6,6$ mg/dl (Tag 39) auf.

C4 zeigt Werte von $27,1 \pm 5,9$ mg/dl (Tag 1), $23,1 \pm 4,4$ mg/dl (Tag 8) und $29,0 \pm 6,2$ mg/dl (Tag 39).

4.1.10. ELEKTROPHORESEN, NICHT REDUZIERTES MATERIAL

Bei der elektrophoretischen Auftrennung des nicht reduzierten Fibrinogenmaterials (Abb.13) lassen sich neben der Bande mit dem Molekulargewicht 340 KD (entspricht intaktem Fibrinogen), eine Bande mit 300 KD (entspricht leicht abgebautem Fibrinogen), sowie eine Bande mit 280 KD (entspricht Pr α -X) nachweisen. Im Verlauf der Lagerungsdauer findet sich eine anteilmäßige kontinuierliche Verschiebung von der Bande 340 KD zugunsten der Bande mit 280 KD.

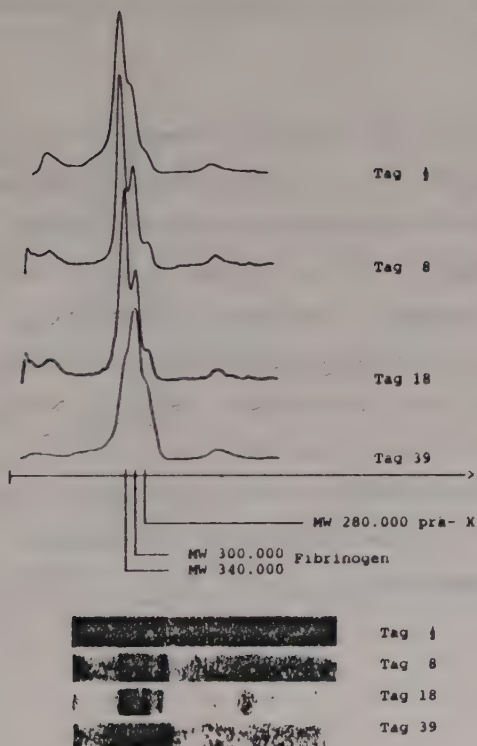


Abb.13: 4% SDS-PAGE-ELPHO mit Scans von Fibrinogenmaterial, das mit Sepharose-Fibrinogenantikörper aus einer Vollblutkonserven im Verlauf der Lagerung isoliert wurde. Nachweis von zwei Fibrinogenbanden sowie prä-X.

4.2.6. ELEKTROPHORESEN, REDUZIERTES MATERIAL

Nach Reduktion des Fibrinogenmaterial in Kettenuntereinheiten lassen sich von Tag $\frac{1}{2}$ bis Tag 39 die intakten α, β und τ -Ketten, jedoch keine dimeren τ -Ketten nachweisen (Abb.14).

Der relative Anteil der A α -Kette am Gesamtanteil des Fibrinogenmaterials (A α , B β , τ) nimmt dabei im Verlauf ab. Die Mittelwerte aller aus den Scans errechneter Werte des Anteils der A α -Kette sind für Tag $\frac{1}{2}$, 4, 8, 18, 25 und 32 in Tabelle 1 angegeben. Dabei kommt es im Lagerungsverlauf zu einer Abnahme des A α -Kettenanteils von $34,7 \pm 2,5 \%$ (Tag $\frac{1}{2}$), $31,0 \pm 2,8 \%$ (Tag 8), $28,2 \pm 2,1 \%$ (Tag 18) bis auf $25,3 \pm 4,5 \%$ (Tag 32).

Mit zunehmenden Anstieg der FCB 3-Werte kommt es somit zu einer kontinuierlichen Abnahme des α -Kettenanteils des Fibrinogenmoleküls.

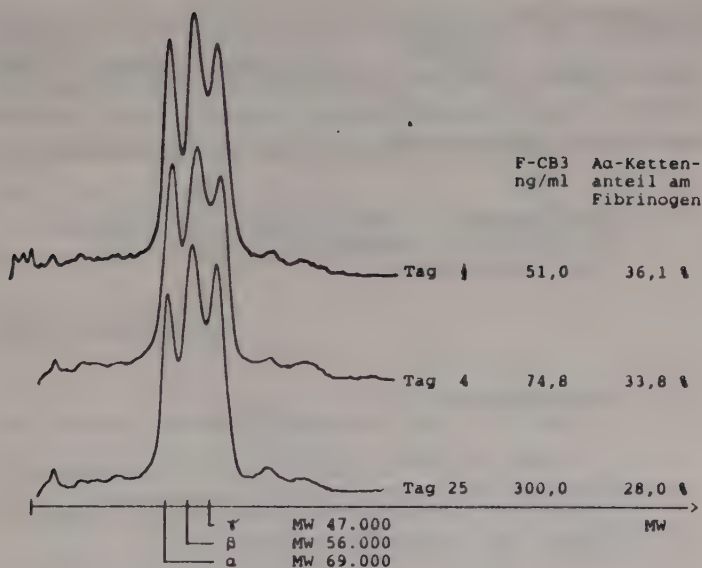


Abb.14: 7,5% SDS-PAGE-ELPHO mit Scans von Fibrinogenmaterial, das mit Sepharose-Fibrinogen-Antikörper aus einer Vollblutkonserve im Verlauf der Lagerung über 25 Tage isoliert und anschließend mit Mercaptoäthanol reduziert wurde. Zusätzlich angegeben sind die F-CB 3-Werte und der % Anteil der Aa-Kette am gesamten Fibrinogenmaterial (Aa, Bβ, γ) in den entsprechenden Proben.

4.2. FRESH FROZEN PLASMA

Fibrinogen mg/dl	FPA ng/ml	α -2-Macro- globulin mg/dl	F-CB3 ng/ml	C3 c mg/dl	C 4 mg/dl	Elastase ng/ml
222 $\pm$ 36	6,3 $\pm$ 2,6	85,2 $\pm$ 26,4	84,8 $\pm$ 32,2	65,5 $\pm$ 11,0	22,5 $\pm$ 3,2	98,6 $\pm$ 41,8

Tab.3: Fibrinopeptid A, F-CB 3, Elastase, α 2-Macroglobulin, C3c und C4-Konzentration gemessen in 20 fresh frozen plasma .

4.2.1. FIBRINOPEPTID A

Der Wert für das FPA liegt mit 6,3 $\pm$ 2,6 g/ml an der oberen Grenze des Normbereiches (Tab.3).

4.2.2. F-CB 3

F-CB3 ist mit 84,8 $\pm$ 31,2 pmol/ml auf das Doppelte der Norm erhöht und entspricht damit in etwa dem Wert einer 1 Tag alten Blutkonserve (Tab.3).

4.2.3. ELASTASE

Elastase liegt in fresh frozen plasma mit einer Konzentration von $98,6 \pm 41,8 \mu\text{g/l}$ im oberen Normbereich (Tab.3).

4.2.4. α -2-MACROGLOBULIN

Der Elastaseinhibitor liegt in einer Konzentration von $85,2 \pm 26,4 \text{ mg/dl}$ vor (Tab.3).

4.2.5. C3c UND C4

Die beiden Complementbestandteile liegen mit ihren Konzentrationen im fresh frozen plasma im Normalbereich. C3c weist dabei eine durchschnittliche Konzentration von $65,6 \pm 11,0 \text{ mg/dl}$, C4 eine Konzentration von $22,5 \pm 3,2 \text{ mg/dl}$ auf (Tab.3).

4.2.6. ELEKTROPHORESEN, NICHT REDUZIERTES MATERIAL

Die elektrophoretische Auftrennung des aus FFP isolierten Fibrinogenmaterials zeigt die dominierenden Banden mit 340 und 300 KD. Daneben finden sich geringe Anteile von prä-X (280 KD) und Y (150 KD) (Abb.15).

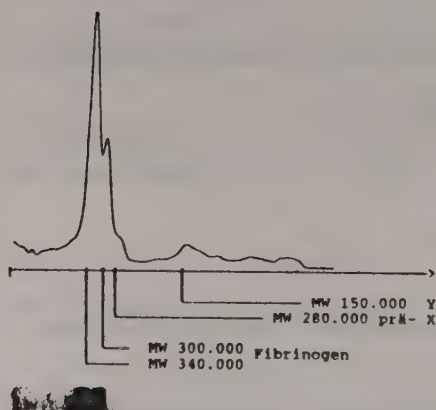


Abb.15: 4% SDA-PAGE-Elpho mit Scan von Fibrinogenmaterial, das mit Sepharose-Fibrinogen-Antikörper aus fresh frozen plasma isoliert wurde. Nachweis von zwei Fibrinogenbanden sowie Spuren von prä-X und Y.

4.2.7. ELEKTROPHORESEN, REDUZIERTES MATERIAL

In der Auftrennung der Kettenuntereinheiten lassen sich die α , β - und γ -Ketten nachweisen. Dimere τ -Ketten kommen nicht zur Darstellung (Abb.16).

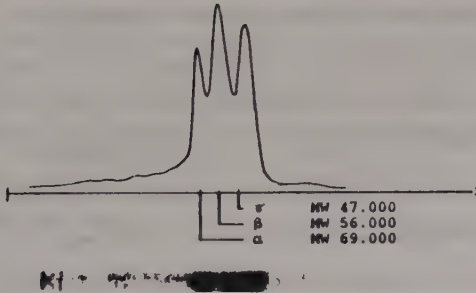


Abb.16: 7,5% SDA-PAGE-ELPHO mit Scan zur Identifizierung der Fibrin(ogen)-Kettenuntereinheiten aus Fibrinogenmaterial, das mit Sepharose-Fibrinogen-Antikörper aus fresh frozen plasma isoliert und mit Mercaptoäthanol reduziert wurde.

5. DISKUSSION

Beim proteolytischen Abbau von Fibrinogen führt die primäre Abspaltung von α -Kettenbruchstücken zu den frühen, noch überwiegend gerinnbaren Abbauprodukten prä-X und X. Das Ausmaß des α -Kettenabbaus läßt sich mit der F-CB3-Konzentration messen. Die im Lagerungsverlauf der Vollblutkonserve ansteigende F-CB3-Konzentration (Abb. 10) entspricht somit einem zunehmenden α -Ketten-Abbau und belegt zunehmende Fibrino(geno)lyse in der Konserve. Diese läßt sich auch anhand der elektrophoretischen Befunde belegen. Parallel zum Anstieg der F-CB3 Werte (Abb.10) kommt es im Lagerungsverlauf zu einer Verschiebung der relativen Anteile von intaktem Fibrinogen (340kD) zum Abbauprodukt prä-X (280kD) (Abb.13). Die elektrophoretischen Auftrennungen der Fibrinogen-Kettenuntereinheiten belegen, daß dieser Abbau im Bereich der A α -Kette des Fibrinogens erfolgt (Abb.14). Er wird deshalb durch die Bestimmung des F-CB3 direkt erfaßt.

Die Elektrophoresen zeigen darüber hinaus, daß ein Abbau über das frühe Fibrinogenolyseprodukt prä-X hinaus nicht erfolgt. Da prä-X noch gerinnbar ist, läßt sich die limitierte Fibrinogenolyse durch Tests, die spätere Abbauprodukte wie das Y, D oder E erfassen, nicht messen. Darüber hinaus führt die nachgewiesene limitierte Fibrinogenolyse auch zu keiner Verminderung der Fibrinogen-Werte, da mit der angewandten Bestimmungsmethode das gesamte gerinnbare Material, also auch prä-X erfaßt wird.

Neben der plasminabhängigen gibt es eine plasminunabhängige alternative Fibrino(geno)lyse, die auf der Freisetzung granulozytärer Proteasen, insbesondere der Elastase, beruht (73, 84-87). Der nachgewiesene Anstieg der Elastase während der Lagerung der Blutkonserve (Abb. 10), sowie die hohe Korrelation zwischen der Elastase und den F-CB3 Werten (Abb 12), deuten darauf hin, daß die Alterung und der Zerfall von Granulozyten bei der zunehmenden Aktivierung der Fibrino(geno)lyse in der Blutkonserve eine wichtige Rolle spielen. Das Auftreten der prä-X Bande (280 kD) bei fehlender X-Bande (240 kD) in den Elektrophoresen ist mit einem Fibrinogenabbau durch PMN-Elastase gut vereinbar (Abb.13).

In vitro Versuche mit limitierter Fibrinogenolyse durch Elastase haben ein dominierendes Spaltprodukt mit einem Molekulargewicht von 270 kD gezeigt, während bei der Fibrinogenolyse durch Plasmin ein rascher Abbau bis zum X (240 kD) erfolgt (86). Trotzdem lassen sich aber die Anteile Plasmin-, bzw Elastase-induzierten Abbaus nicht sicher voneinander abgrenzen.

Thrombin spaltet vom Fibrinogen das Fibrinopeptid A (FPA) ab und leitet damit dessen Polymerisation zu Fibrin ein. Dieses wird schließlich durch die gleichzeitige Aktivierung einer Transglutaminase (F XIIIa) durch Quervernetzungen benachbarter Moleküle im τ - und α -Kettenbereich stabilisiert. Der geringe Anstieg der FPA-Werte (Tab.1, Abb.8) und der fehlende elektrophoretische Nachweis quervernetzter Fibrinderivate, sowohl im nicht reduzierten (Abb.13) wie im reduzierten Material (Abb.14), belegen, daß in den Blutkonserven nur eine minimale Thrombinaktivierung und Quervernetzung von Fibrin erfolgt.

Auch wenn die Fibrinogenolyse in den Blutkonserven nur bis zum Abbauprodukt prä-X führt, muß ihr Beachtung geschenkt werden. Bereits im Initialstadium des Fibrinogenabbaus durch Plasmin oder Elastase entstehen neben den α -Kettenbruchstücken, die durch das F-CB3 erfaßt werden, weitere Bruchstücke. Davon konnten einige isoliert werden. Sie zeigen im Tierversuch ausgeprägte vasoaktive und permeabilitätssteigernde Eigenschaften. (23,92,93) Vermutlich imitieren sie auf Grund identischer Abschnitte in der Aminosäuresequenz mit natürlich vorkommenden Hormonen deren Wirkung (92).

Während in vivo solche Peptide einem weiteren Abbau unterliegen und eliminiert werden, lassen die ansteigenden F-CB3-Werte eine Akkumulation in älteren Blutkonserven erwarten. Eine Reihe von Nebenwirkungen insbesondere älterer Blutkonserven, die bisher nicht erklärt werden können, sind möglicherweise auf solche und andere, noch nicht identifizierte Stoffwechselprodukte in den Blutkonserven zurückzuführen. Auch wenn die klinische Bedeutung solcher Stoffwechselprodukte bei der Transfusion im Einzelnen noch nicht abzuschätzen ist, zeigen die Untersuchungen, daß mit der Bildung potentiell schädlicher Abbauprodukte im Verlauf der Lagerung von Blutkonserven grundsätzlich gerechnet werden muß.

Im Vergleich mit den Vollblutkonserven kommt es im fresh frozen plasma nur zu einer geringen Aktivierung der Gerinnung und der Fibrinogenolyse. Eine Freisetzung von Elastase wird nicht beobachtet (Tab.3). Die Elektrophoresen, die nur geringe Anteile an leicht abgebautem Fibrinogen (300kD) und prä-X (240 kD) erkennen lassen (Abb.15), bestätigen die geringe Proteolyse im fresh frozen plasma.

6. ZUSAMMENFASSUNG:

Während der Lagerung der Vollblutkonserve kommt es durch Alterung und Zerfall von Granulozyten zur Freisetzung von Proteasen, die unter anderem fibrino(geno)lytische Eigenschaften haben. Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit untersucht, ob und in welchem Umfang fibrino(geno)lytische Prozesse in der Vollblutkonserve ablaufen. Fresh frozen plasma wird in die Untersuchungen mit einbezogen, da es in Kombination mit Erythrozytenkonzentraten eine Alternative zur Transfusion von Vollblutkonserven darstellt.

Als Markerenzym für die beim Granulozytenzerfall fre werdenden Proteasen wird die Elastase herangezogen. Das Ausmaß abgelaufener Fibrino(geno)lyse wird mit Hilfe des F-CB3-verwandten Antigens (F-CB3) gemessen, das ein frühes Abbauprodukt der Aa-Kette des Fibrinogens erfasst. Zur Charakterisierung der auf der molekularen Ebene des Fibrinogen-Moleküls angreifenden Proteolyse wird das Fibrinogen-Material mittels Fibrinogen-Antikörper-Sepharose-4B aus dem Plasma isoliert und auf SDS-PAGE aufgetrennt. Untersucht werden 20 Vollblutkonserven im Lagerungsverlauf über 39 Tage sowie 20 fresh frozen plasma.

Die Elastase steigt im Lagerungsverlauf von $95 \pm 44 \mu\text{g/l}$ (Tag 2) kontinuierlich auf $3492 \pm 954 \mu\text{g/l}$ (Tag 39) an. In der selben Zeit zeigt das F-CB3 eine Zunahme von $70,7 \pm 16,4 \text{ ng/ml}$ auf $356,3 \pm 110 \text{ ng/ml}$ und belegt in der Vollblutkonserve abgelaufene Fibrino(geno)lyse. Die hohe Korrelation der Elastase- mit den F-CB3-Werten ($r=0,73$ bei $n=180$) weist auf einen Zusammenhang zwischen der Freisetzung granulozytärer Enzyme und der Fibrino(geno)lyse hin.

Die elektrophoretischen Auftrennungen belegen, daß in der Vollblutkonserve das intakte Fibrinogen (340 KD) über leicht abgebautes Fibrinogen (300 KD) nur bis zu prä-X (280 KD) abgebaut wird. Dabei nimmt im Lagerungsverlauf der Anteil von prä-X gegenüber dem Anteil von intaktem Fibrinogen (340 KD) zu. Die Auftrennung in Kettenuntereinheiten zeigt, daß die limitierte Proteolyse an der A α -Kette des Fibrinogens erfolgt. Diese elektrophoretischen Befunde stehen somit in guter Übereinstimmung mit dem F-CB3-Anstieg im Lagerungsverlauf. Die Limitierung der Fibrinogenolyse nur bis zum noch gerinnbaren prä-X erklärt, warum trotz hoher F-CB3-Werte die Fibrinogen-Konzentration (gerinnbares Protein) im Lagerungsverlauf nicht signifikant abnimmt.

Die Elastase ($98,6 \pm 41,8 \mu\text{g/l}$) und das F-CB3 ($84,8 \pm 31,2 \text{ ng/ml}$) sowie das Fibrinogen-Abbaumuster der elektrophoretischen Auftrennungen des FFP entsprechen den Befunden von Vollblutkonserven, die etwa 2 Tage alt sind.

Da für einige der bei der limitierten Fibrinogenolyse der A α -Kette entstehenden Peptide vasoaktive und permeabilitätssteigernde Effekte nachgewiesen werden konnten (23, 92,93), muß mit Nebenwirkungen der in der Vollblutkonserve akkumulierenden Fibrinogenolyseprodukte gerechnet werden . Es erscheint deshalb sicherer, anstelle von älteren Vollblutkonserven fresh frozen plasma in Kombination mit Erythrozytenkonzentraten zu transfundieren.

7. LITERATUR

1. Bachmann L., Schmitt-Fumian W., Hammel R.,
Lederer K.
Size and shape of fibrinogen
I. Electronmicroscopy of the hydrated molecule
Die Makromolekulare Chemie, 176, 2603-2618 (1975)
2. Baugh R.J., Travis J.
Human leucocyte elastase: Rapid isolation and
characterization
Biochemistry 15 836 1976
3. Bennett S.H., Geelhoed G.W., Aaron R.K., Solis R.T.,
Hoye R.C.
Pulmonary injury resulting from perfusion with stored
bank blood in the baboon and dog
J. Surg. Res: 13-245 (1972)
4. Bianco C.
in Good R.A., Day S.B. (Eds.):
Biological amplification systems in immunology
Plenum, New York, London 1977

5. Belitser V.A. et al.

Quantitation of the inhibitory effect of fibrinogen
and its degradation products on fibrin
polymerization

Thrombosis Research, 27, 261-269 (1982)

6. Blakesley R.W., Boezi J.A

A new staining technique for proteins in poly-
acrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G 250
Analytical Biochemistry 82, 580-582 (1977)

7. Blombäck M., Blombäck B., Holmquist H.

Immunological Characterization of Early Fibrinogen
Degradation Products. RIA of fragments released from
the A α -Chain of fibrinogen

Thromb. Res. 8, 567, 1976

8. Blombäck M., Chmielewska J., Nètré C., Åkerblom O.

Activation of Blood Coagulation, Fibrinolytic and
Kallikrein Systems during Storage of Plasma

Vox. Sang. 47: 335-342 (1984)

9. Blombäck B., Yamashina I.

On the N-terminal amino acids in fibrinogen and
fibrin

Arkiv Kemi 12, 299 (1958)

10. Blombäck B., Blombäck M.

The molecular structure of fibrinogen

Ann. N.Y. Acad. Sci. 202, 77-97 (1972)

11. Blombäck B. et al.

Primary structure of human fibrinogen and fibrin

Journal of Biological Chemistry 248, 5806-5820

(1973)

12. Blombäck B., Hessel B., Hogg D.

Disulfide bridges in NH₂-terminal part of human
fibrinogen

Thrombosis Research 8, 639-658 (1976)

13. Blombäck B.

Fibrinogen and fibrin formation

in: Fibrinolitics and antifibrinolitics, 49-80

ed.: Markwardt F.

Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1978)

14. Caspary E.A., Kekwick R.A.

Some physicochemical properties of human fibrinogen
Biochem. J. 67, 41-48 (1957)

15. Collins J.A.

Problems associated with massive transfusion of
stored blood
Surgery, 75, 274-295 (1974)

16. Collins J.A., James P.M., Bredenberg C.E.,

Anderson R.W., Heisterkamp C.A., Simmons R.L.
The relationship between transfusion and hypoxaemia
in combat casualties
Ann. Surg. 188:513 (1978)

17. Conneil R.S., Swank R.L.,

Pulmonary microembolism after blood transfusion: an
electronic microscopic study
Ann. Surg. 177, 40 (1973)

18. Craddock C.G.

Granulocyte Kinetics
in: Williams, Beutler, Erslev, Rundles (eds):
Hematology, Mc Graw Hill, NY, 593, 1972

19. Dawidson I., Barrett J.A., Mitter E., Litwin M.S.
Pulmonary microembolism associated with massive
transfusion : I. Physiologic effects and comparison
in vivo of standard and dacron wool (Swank) blood
transfusion filter in its prevention
Ann. Surg. 181, 51 (1975)
20. Delshammer M., Ohlsson K.
Granulocyte collagenase and elastase and the plasma
protease inhibitors in human pus
Sur. 83, 323, 1978
21. Dewald B.R., Rindler-Ludwig R., Bretz U., Bagglioni
M.
Sub cellular localization and heterogeneity of
neutral proteases in neutrophilic polymorphonuclear
leukocytes
J. Exp. Med, 141, 709, 1975
22. Doolittle R.F.
Fibrinogen: Hauptakteur bei der Blutgerinnung
Spektrum der Wissenschaft 2, 58-69 (1982)

23. Eriksson M., Gerdin B., Saldeen T

Enhancement of the permeability-increasing effect of
bradykinin and substance P by a peptide derived from
fibrinogen

Int. J. Microcirc: Clin. Exp 2, 53-59 (1983)

24. Feinstein G., Janoff A.

Purification and characterization of human
granulocyte chymotrypsin-like enzyme

Biochem. Biophys. Acta 403, 1975, 477

25. Fowler W.E., Erickson H.P.

The trinodular structure of fibrinogen:
confirmation by both shadowing and negative stain
electron microscopy

Journal of Molecular Biology 134, 241-9 (1979)

26. Furlan M., Beck E.A.

Plasmic degradation of human fibrinogen

I. Structural characterization of degradation
products

Biochim. Biophys. Acta 263, 631-644 (1972)

27. Furlan M., Beck E.A.

Plasmic degradation of human fibrinogen

II. Further characterization of fragment D

Biochim. Biophys. Acta 310, 205-216 (1973)

28. Furlan M., Kemp G., Beck E.A.

Plasmic degradation of human fibrinogen

III. Molecular model of the plasmin-resistant
disulfide knot in monomeric fragment D

Biochim. Biophys. Acta 400, 95-111 (1975)

29. Furlan M., Seelich T., Beck E.A.

Plasmic degradation of human fibrinogen

IV. Identification of subunit chain remnants in
fragment Y

Biochim. Biophys. Acta 400, 112-120 (1975)

30. Furthmayer H., Timpl R.

Characterization of collagenpeptides by

sodium-dodecylsulfate-polyacrylamide

electrophoresis

Anal. Biochem. 41, 510, 1971

31. Gerber A.C., Carson J.H., Hadorn B.

Partial purification and characterization of a
chymotrypsin-like enzyme from human neutrophil
leukocytes

Biochem. Biophys. Acta, 364, 103, 1974

32. Gollwitzer R. et al.

Chemical and immunological properties of reduced
and alkylated polypeptide chains of bovine
fibrinogen

European Journal of Biochemistry 28, 497-506 (1972)

33. Gollwitzer R., Hafter R., Timpl R., Graeff H.

Immunological Assay for a Carboxyterminal Peptide of
the Fibrinogen A- α -Chain in Normal and Pathological
Human Sera

Thromb. Res. Vol 11, 859-868, 1977

34. Graeff H., Hafter R., Bachmann L.,

Subunit and macromolecular structure of circulating
fibrin. Obstrectical patients with intravascular
coagulation

Thromb. Res. 16, 313-328, 1979

35. Gramse M., Bingenheimer C., Havemann K.

Granulocyte Elastase and its Interference with
Fibrinogen

in: Neutral Proteases of Human PMN Leukocytes, Urban
und Schwarzenberg 1978

36. Gramse M., Bingenheimer C., Schmidt W., Egbring R.

Haveman K.

Degradation Products of Fibrinogen by Elastase-like
Neutral Protease from Human Granulocytes

J. Clin. Invest. 21, 1027-1033, 1977

37. McGuire W.M., Spragg R.C., Cohen A.B., Cochrane
C.G.

Studies on the Pathogenesis of the Adult Distress
Syndrome

J. Clin. Invest. Volume 69 March 1982, 543-553

38. Hafter R., Graeff H.

Estimation of soluble fibrin monomer complexes by
agarose gel filtration

In: Progress in Chemical Fibrinolysis and
Thrombolysis, Vol.2,

hrsg. von Davidson J.F., Samama M.M.,

Desnoyers P.C., Raven Press, New York 1976

39. Hafter R., v. Hugo R., Greaff H.

Markerfunktion von Fibrinderivaten verschiedener
Entstehungsart

In: Fibrinogen, Fibrin und Fibrinkleber hrsg: Schimpf
K. Schattauer, Stuttgart, 121-124 (1980)

40. Hall C., Slayter H.

The fibrinogen molecule: its size, shape and mode
of polymerization

Journal of Biophysical and Biochemical Cytology 5,
11-15 (1959)

41. Harke H.

Massivtransfusionen, Hämostase und Schocklunge
Anaesthesiologie und Intensivmedizin, Vol 146
(Springer, Berlin 1982)

42. Harke H.

Beeinflussung der Mikroaggregation in lagernden
Blutkonserven

Änaesthesist 25, 374-379 (1976)

43. Harke H., Stienen G., Rahmann S., Flohr H.

Aprotin-A CD- Blut II. Der Einfluss von Aprotinin
auf die Freisetzung zellulärer Mediatoren und Enzyme
im Konservenblut

Anaesthesist 31:165 (1982)

44. Harp

Some factors determining rate of microaggregate
formation in stored blood

Anaesthesiology 40: 398

45. Henschen A.

Number and reactivity of disulfide bonds in
fibrinogen and fibrin

Arkiv Kemi 22, 355 (1964)

46. Henschen A., Blombäck B.

Amino acid composition of human and bovine
fibrinogen and fibrin

Arkiv Kemi 22, 347-354 (1964)

47. Henschen A.

Fibrinogen - Blutgerinnungsfaktor I

Hämostaseologie 1, 30-40 (1981)

48. Janoff A., Feinstein G.

Granulocyte Elastase: Isolation and Characterization
in: Neutral Proteases of Human PMN Leukocytes Urban &
Schwarzenberg, 1978

49. Janoff A., Scherer J.

Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes
J. Exp. Med. 128 (1968) 1137

50. Jenevein E.P., Weiss D.L.

Platelet Microemboli associated with massive blood
transfusion
Am. J. Pathol. 45: 318, 1964

51. Kline D.L.

Chemistry and biochemistry of the fibrinolytic
system
Federation Proceedings 25, 31-33 (1966)

52. Kopec M., Latallo Z.S.

Fibrinogen and fibrin degradation products
in: Fibrinolytics and antifibrinolytics, 81-105
ed.: Markwardt F.
Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1978)

53. Landmann H.

Biochemistry of the factors of the fibrinolytic
system
in: Fibrinolytics and antifibrinolytics, 3-48
ed.: Markwardt F.
Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1978)

54. Lazarus G.S., Daniels J.R., Brown S., Bladen H.A.,
Fullmer H.M.

Degradation of collagen by human granulocyte
collagenolytic system
J. Clin. Invest 47, 2622, 1968

55. Lebreton de Vonne T., Mouray H.

Human $\alpha 2$ -macroglobulin and its antitrypsic and
antithrombin activities in serum and plasma
Clin. Chim. Acta 90, 83-85 (1978)

56. Lucas M.A., Fretto L.J., McKee P.A.

The relationship of fibrinogen structure to
plasminogen activation and plasmin activity during
fibrinolysis

In: Molecular Biology of Fibrinogen and Fibrin
eds.: Mosesson M.W., Doolittle R.F.

Annals of the New York Academy of Sciences,
Vol. 408, 71-91 (1983)

57. Lundsgaard-Hansen P.

Is There a Rationale for Using a Proteinase Inhibitor
as a Standard Additive to Stored Blood?

Vox Sang 45: 1-5, 1983

58. Marder W.J., Shulman N.R., Carroll W.R.

High molecular weight derivatives of human
fibrinogen produced by plasmin

I. Physicochemical and immunological
characterization

Journal of Biological Chemistry 244, 2111-2119
(1969)

59. Mihalyi E.

Kinetics and molecular mechanism of the proteolytic
fragmentation of fibrinogen

In: Molecular Biology of Fibrinogen and Fibrin

eds.: Mossesson M.W., Doolittle R.F.

Annals of the New York Academy of Sciences,

Vol. 408, 60-70, (1983)

60. Mills D., Karparkin S.

Heterogeneity of human fibrinogen: possible relation
to proteolysis by thrombin and plasmin as studied by
SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

Biochemical and Biophysical research communications

40, 206-211, (1970)

61. Moroz L.

Nonplasmin-mediated Fibrinolysis

Sem. Thromb. Res. Vol10, 1, 1984

62. Muellertz S.

Fibrinolysis: An overview

Seminars in Thrombosis and Hemostasis 10(1), 1-5

(1984)

63. Nossel H.L., Younger L., Wilner G.D., Procupez T.,
Canfield R.E., Butler V.P.
Radioimmunoassay of human fibrinopeptide A
Proc. Natl. Acad. Sci. 68, 2350-2353 (1971)
64. Nossel H.L., Yudelman I., Canfield R.E., Butler
V.P., Spandonis K., Wilner G.D., Quereshi G.D.
Measurement of fibrinopeptide A in human blood
Journal of Clinical Investigation 54, 43-53 (1974)
65. Nossel H.L., Hurlet-Jensen A., Liv Y.C., Koehn A.,
Canfield R.E.
Fibrinopeptide Release from Fibrinogen
In: Molecular Biology of Fibrinogen and Fibrin
ed.: Mosesson M.W., Doolittle R.F.
Annals of the New York Academy of Sciences,
Vol. 408, 269-278 (1983)
66. Ohlsson K.
Elimination of 125-Trypsin- α -macro-globulin complexes
from blood by reticuloendothelial cells in dog
Acta Phys. Scand. 81, 269, 1971

67. Ohlsson K.

Properties of Leukocytic Protease

Clin. Chem. Acta 32 (1971)

68. Ohlsson K.

Interaction of Granulocyte Neutral Proteases with

α -1-Anti- trypsin, α -2-Macroglobulin and

α -1-Antichymotrypsin

in: Neutral Proteases of PMN Leukocytes , Urban und
Schwarzenberg, 1978

69. Ohlsson K.

Purification and properties of granulocyte

collagenase and elastase.

In: Neutral Proteases of PMN Leukocytes , Urban und
Schwarzenberg, 1978

70. Ohlsson K.

Granulocyte collagenase and elastase and their

interaction with α 1-AT and α 2-M

in: Proteases and biological control

Golspring Harbor Laboratory, p.591, 1975

71. Ohlsson K., Laurell C.B.

The disappearance of enzyme-inhibitor complexes from
the circulation of man

Clin. Sci. Mol. Med. 51, 87, 1976

72. Ohlsson K., Olsson I.

The neutral proteases of human granulocytes.

Isolation and partial characterization of two
granulocyte collagenases

Eur. J. Biochem. 36, 473, 1973

73. Ohlsson K., Olsson I.

The Neutral Proteases of Human Granulocytes.

Isolation and Partial Characterization of Granulocyte
Elastases

Eur. J. Biochem. 42 (1974) 519-527

74. Ohlsson K., Olsson I.

Neutral Proteases of Human Granulocytes, III.

Interaction between Human Granulocytic Elastase and
Plasma Proteinase Inhibitors.

Scand. J. Clin. Invest 34: 349-355, 1974

75. Ohlsson K., Olsson I.

The extracellular release of granulocyte collagenase
and elastase during phagocytosis and inflammatory
process

Scand. J. Haematol. 19 (1975) 145

76. Ohlsson K., Olsson A.S.

Immunoreactive granulocyte elastase in human serum
Hoppe-Seyler's Z. Phys. Chem. 359, 1531, 1978

77. Ohlsson K., Olsson I., Spitznagel J.

Localization of Chymotrypsin-like Cationic Protein,
Collagenase and Elastase in Azurophilic Granules of
Human Neutrophilic PMN Leukocytes

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358: 361-366, 1977

78. Ohlsson K., Skude G.

Demonstration and semiquantitative determination of
complexes between various proteases and human
 α_2 -macroglobulin

Clinica Chimica Acta 66, 1, 1976

79. Opie E.L.

Enzymes and antienzymes of inflammatory exsudates

J. Exp. Med. 7, 316, 1905

80. Opie E.L.

Intracellular digestion. The enzymes and antienzymes concerned.

Physiol. Rev. 2, 552, 1922

81. Pizzo S.V., Schwartz M.L., Hill R.L., McKee P.A.

The effect of plasmin on the subunit structure of human fibrin

Journal of Biological Chemistry 247, 636-645 (1972)

82. Pizzo S.V., Schwartz M.L., Hill R.L., McKee P.A.

The effect of plasmin on the subunit structure of human fibrin

Journal of Biological Chemistry 248, 4574-4583

(1973)

83. Pizzo S.V., Schwartz M.L., Hill R.L., McKee P.A.

Subunit structure of fragment D from fibrinogen and cross-linked fibrin

Journal of Biological Chemistry 248, 4584-4590

84. Plow F.

The Major Fibrinolytic Proteases of Human
Leukocytes.

Biochim. Biophys. Acta 630: 47-56, 1980

85. Plow F., Edgington T.S.

An Alternative Pathway for Fibrinolysis. I. The
cleavage of Fibrinogen by Leucocyte Proteases at
physiologic pH.

J. Clin Invest 56 (1975a) 30-38

86. Plow F., Edgington T.S.

Comparative Immunochemical Characterization of
Products of Plasmin and Leukocyte Protease Cleavage
of Human Fibrinogen

Thromb. Res. 12: 653-665, 1978

87. Plow F., Edgington T.S.

The Fibrinolytic Pathway of Leucocytes
in: Neutral Proteases of PMN Leucocytes
Urban & Schwarzenberg 1978

88. Plow E.F., Edgington T.S., Cierniewski C.S.

Immunochemical Analysis of the Conformation of
Fibrinogen

In: Molecular Biology of Fibrinogen and Fibrin

eds.: Mosesson M.W., Doolittle R.F.

Annals of the New York Academy of Sciences, Vol. 408
44-59 (1983)

89. Plow F., Plesica J.

Non-plasmin mediated fibrinolysis

in: Progress in fibrinolysis V: 70, 1981

90. Reul G.J., Beall A.C., Greenberg S.D.

Protection of the pulmonary microvasculature by fine
screen blood filtration

Chest 66: 4, 1974

91. Reul G.J., Greenberg S.D., Lefrak E.A., McCollum
W.B., Beall A.C., Jordan G.L.

Prevention of post-traumatic pulmonary insufficiency.

Fine screen filtration of blood

Archs. Surg. 106:386 (1973)

92. Saldeen T.

Vasoactive Peptides derived from degradation of
fibrinogen and fibrin

Ann. N. Y. Sci. p. 424-437, 1983

93. Saldeen T.

Fibrin-derived peptides and pulmonary injury
in Malik, Staub: Mechanisms of lung microvascular
injury

Ann. N. Y. Acad. Sci. 384:319 (1982)

94. Schmeller M.L., Hafter R., Stemberger A., Graeff H.,
Blümel G.

Plasmin and elastase induced degradation products and
their action on vascular permeability: an experimental
study

in: Fibrinogen-recent biochemical and medical
aspects, de Gruyter, 1982

95. Schmidt W., Havemann K.

Isolation of elastase-like and chymotrypsin-like
neutral proteases from human granulocytes

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 365, 1077, 1974

96. Shapiro A.L., Viñuela E., Maizel J.V.

Molecular weight estimation of polypeptide chains by
electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels

Biochemical and Biophysical Research Communications,
28, 815, 1967

97. Schneider W., Schorer R

Klinische Transfusionsmedizin

edition medizin 1982

98. Slayter H.S.

Electron microscopic studies of fibrinogen.

Structure: Historical perspectives and recent
experiments

In: Molecular Biology of Fibrinogen and Fibrin

eds.: Mosesson M.W., Doolittle R.F.

Annals of the New York Academy of Sciences, Vol. 408

131-145 (1983)

99. Stachurska J.

Effects of peptides cleaved from human fibrinogen by
plasmin on rabbit kidney cells in culture

Thromb. Res. 29, 419-424, 1983

100. Swank R.L.

Alteration of blood on storage: Measurement of
adhesiveness of "aging" platelets and leucocytes,
their removal by filtration

N. Engl. J. Med. 265:728, 1961

101. Takaori M., Nakajo N., Ishih T.

Changes of Pulmonary Function Following Transfusion
of Stored Blood

Transfusion Nov-Dec 1977

102. Taylor J.C., Crawford I.P.

Purification and preliminary characterization of
human leukocyte elastase

Arch. Biochem 169, 91, 1975

103. Thompson A.R., Harker L.A.

Manual of Hemostasis and Thrombosis ed.3

F.A. Davis Company, Philadelphia (1983)

104. Travis J., Baugh R., Giles P., Johnson D., Bowen J.
Human Leukocyte Elastase and Cathepsin G:
Isolation, Characterization and Interaction with
Plasma Proteinase Inhibitors
in: Neutral Proteases of Human PMN Leukocytes, Urban
und Schwarzenberg, 1978
105. Wallin R., Belew M., Ohlsson K., Saldeen T.
Purification of vasoactive peptides from human
fibrinogen degraded by human leukocyte elastase
Thrombos. Haemostas. 46:52 (1981)
106. Weber K., Osborn M.
The reliability of molecular weight determinations
by dodecylsulfate-polyacrylamide gel
electrophoresis
The Journal of Biological Chemistry 244, 4406-4412,
1969
107. Witt I.
Biochemie der Blutgerinnung und Fibrinolyse
Chemie, Weinheim (1975)

D A N K S A G U N G

Herrn Prof. Dr. W. Wilmanns danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes.

Zu besonderem Dank verpflichtet bin ich Herrn Dr. W. Klaubert für die zahlreichen Anregungen beim experimentellen Teil der Arbeit. Ohne seine beispielhafte Betreuung und Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Frau Dr. R. Gollwitzer, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, danke ich für die Hilfe bei Bestimmung der F-CB3-Werte.

LEBENS LAUF

30.03.1959 Geboren in Stuttgart als Sohn von Anna E. Schulte-Derne, geb. Buschmann, und Hellmut E. Schulte-Derne, Industriekaufmann

1966-1969 Grundschule in Notzingen/ Baden-Württemberg

1970 1. Klasse Ludwig-Uhland-Gymnasium,
Kirchheim / Teck

1970-1975 2.-6. Klasse Städtisches Schlossgymnasium,
Düsseldorf-Benrath

1975-1978 7.-9. Klasse Gymnasium Hohenbaden,
Baden-Baden

1978 Allgemeine Hochschulreife

1979 Einjähriges Berufspraktikum bei Daimler-Benz
Sindelfingen

SS 1980 Beginn des Medizinstudiums an der Ludwig-
Maximilians-Universität, München

8.1982 Ärztliche Vorprüfung

8.1983 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

8.1985 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

10.1986 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

